

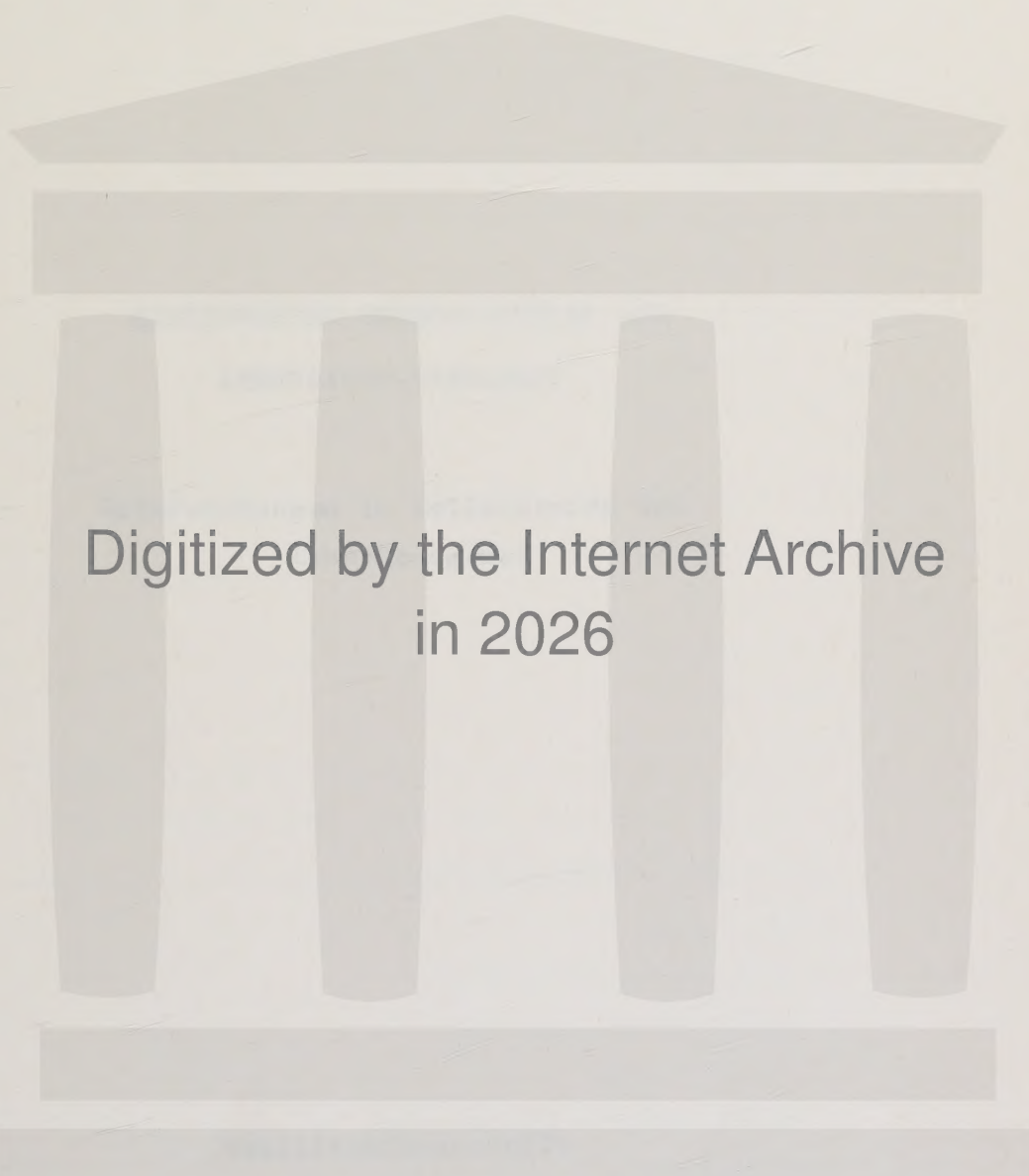
*Kinderklinik C der Medizinischen Einrichtungen der
Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. H. J. Bremer*

*BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
AHORNSIRUP - KRANKHEIT*

*Untersuchungen in Zellkulturen und
Leberhomogenat*

von Udo Wendel

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548220_0023

Kinderklinik C der Medizinischen Einrichtungen der
Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. H.J. Bremer

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
AHORNSIRUP-KRANKHEIT

Untersuchungen in Zellkulturen und
Leberhomogenat

Habilitationsschrift
für das Fach Kinderheilkunde

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt

von

Dr. med. Udo Wendel

1980

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Eigene Untersuchungen und Fragestellung	9
<u>A: Untersuchungen zur BCAA- . BCKA-Dekarb- oxylierung in Fibroblasten und Amnion- zellen</u>	
Einleitung	11
Materialien und Methodik	12
Zellkultur	12
Materialien	13
BCKA-Dekarboxylierung in intakten Zellen	14
Ergebnisse und Diskussion	15
<u>B: Untersuchungen zur Pränataldiagnostik</u>	
Einleitung	25
Methodik	26
Ergebnisse	28
Diskussion	31
<u>C: Untersuchungen zur Lokalisation des gene- tischen Defekts im BCKA-Dehydrogenasekom- plex der Leber bei MSUD</u>	
Einleitung	37
Material und Methodik	38
BCKA-Dehydrogenase	38
Inkubation	40
BCKA-Dekarboxylase(E_1)	40
Ergebnisse	42
Diskussion	49
<u>D: Untersuchungen zum Stoffwechsel von KICA und Leucin in Fibroblasten-Kulturen</u>	
Einleitung	53
Methodik	57

Messung der intrazellulären Leucin- und KICA-Konzentrationen	57
Messung der Leucin- und KICA-Aufnahme in die Zellen	58
Ergebnisse	59
Diskussion	66
1. Intermediärstoffwechsel von Leucin und KICA in Fibroblasten	66
2. Interpretation der Kinetiken der KICA- und Leucin-Dekarboxylierung in Fibroblasten	72
3. Bedeutung der zwei Enzymkomponenten der BCKA-Dekarboxylierung in Fibroblasten	76
Zusammenfassung	81
Literatur	85

In der Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

MSUD	= Ahornsirupkrankheit (maple syrup urine disease)
BCAAs	= verzweigtkettige Aminosäuren (branched chain amino acids)
BCKAs	= verzweigtkettige α -Ketosäuren (branched chain α -keto acids)
KICA	= α -Ketoisocapronsäure (α -keto isocaproic acid)
KIVA	= α -Ketoisovaleriansäure (α -keto isovaleric acid)
MEVA	= α -Keto- β -methylvaleriansäure (α -keto- β -methyl valeric acid)
TPP	= Thiaminpyrophosphat
NAD	= Nikotinamid-Dinucleotid
CoASH	= Coenzym A
DCP	= Dichlorphenolindophenol
PBS	= Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
HEPES	= N-2-hydroxyäthylpiperazinpropamin Sulfonsäure
V _{max}	= Maximalgeschwindigkeit
K _m	= Michaelis-Konstante

E I N L E I T U N G

Die drei verzweigtkettigen α -Ketosäuren: KICA (α -Keto-isocaproonsäure), KIVA (α -Ketoisovaleriansäure) und MEVA (α -Keto- β -methylvaleriansäure), Ketosäurenanaloge der essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin werden durch einen mitochondrialen Multienzymkomplex (BCKA-Dehydrogenase) oxidativ dekarboxyliert.

Der Ahornsirupkrankheit (MSUD) liegt ein erblicher Defekt des BCKA-Dehydrogenasekomplexes zugrunde (DANCIS u. Mitarb., 1960) (Abb. 1). Die Kapazität zur oxidativen Dekarboxylierung der verzweigtkettigen Substanzen ist entsprechend der Verminderung der BCKA-Dehydrogenaseaktivität eingeschränkt. Die Konzentrationen der α -Ketosäuren, die durch ungestörte reversible Transaminierung aus den verzweigtkettigen Aminosäuren entstehen, sowie die der Aminosäuren selbst (inklusive Alloisoleucin), sind im Gewebe, Blut und Liquor cerebrospinalis erhöht, und eine vermehrte Ausscheidung, vorwiegend der α -Ketosäuren und ihrer Hydroxysäurenanaloge erfolgt im Urin (WESTALL u. Mitarb., 1957; MENKES, 1959; DENT u. WESTALL, 1961; DREYFUS u. PRENSKY, 1967; DANCIS u. LEVITZ, 1978; neuere Daten, durch Gaschromatographie gewonnen: LANCASTER u. Mitarb., 1974; JAKOBS u. Mitarb., 1977; LANGENBECK u. Mitarb., 1978; WENDEL u. Mitarb., 1980). Die Therapie besteht in einer diätetischen Restriktion der verzweigtkettigen Aminosäuren (SNYDERMAN u. Mitarb., 1964; SCRIVER u. Mitarb., 1976), um die Konzentration der z.T. toxischen verzweigtkettigen Aminosäuren und Analogen im Körper niedrig zu halten.

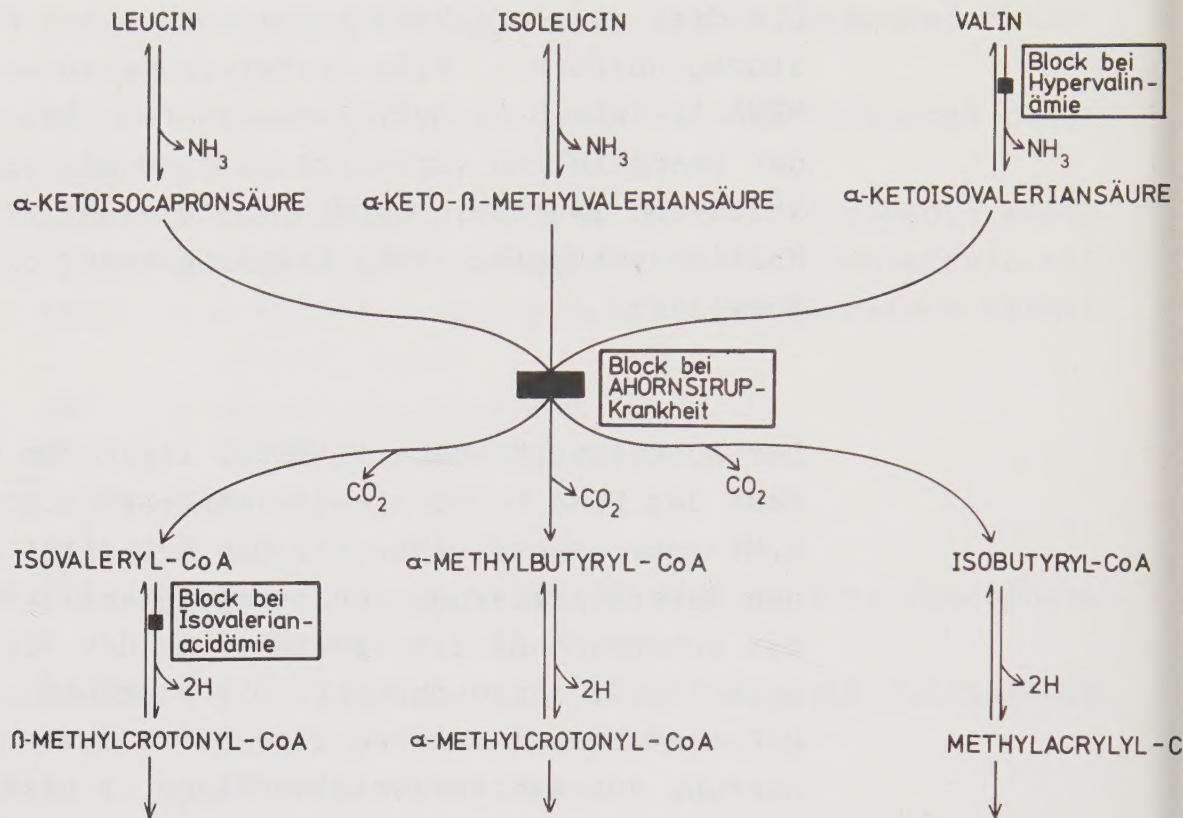


Abb. 1

Erbliche Stoffwechselstörungen der verzweigtkettigen Aminosäuren (nach EFRON u. AMPOLA, 1967). Weitere Defekte (z.B. Propionacidämie, α-Methylmalonacidurie) betreffen tiefer gelegene Abbauschritte einzelner verzweigtkettiger Aminosäuren (Valin und Isoleucin).

Bei der Ahornsirupkrankheit (MSUD) ist die oxidative Dekarboxylierung der drei verzweigtkettigen α-Ketosäuren gleichzeitig gestört. Die Erstbeschreibung des klinischen Bildes erfolgte 1954 durch MENKES u. Mitarb.. Der Name stammt von dem ahornsirup- bzw. maggiähnlichen Geruch der Patienten und des Urins bei hoher BCKA-Konzentration im Blut und Urin. Die Häufigkeit der autosomal-rezessiv erblichen Krankheit beträgt nach den Daten des Neugeborenen-screensings zwischen 1:121.000 (europäische Daten, 1973) und 1:224.000 (NAYLOR u. GUTHRIE, 1978).

Mäßig erhöhte Metabolitenspiegel verursachen fortschreitende neurologische Schäden. Bei sehr hohen Konzentrationen treten zusätzlich schwere, akut-toxische cerebrale Funktionsstörungen wie Ataxie, Erbrechen, Apathie, Apnoen und Coma auf. Die Ätiologie der cerebralen Störungen, die die Krankheitssymptomatik ausmachen, ist nicht eindeutig geklärt (GAULL u.Mitarb., 1975). Eine zentrale Stellung in der Auslösung neurologischer Symptome dürfte dem durch hohe KICA-Konzentration gehemmten Kohlenhydratmetabolismus auf der Stufe der Pyruvatoxidation (BOWDEN u.Mitarb., 1971) und der Hemmung mitochondrialer Transportphänomene (CLARK u. LAND, 1975; GIBSON u. BLASS, 1976; PATEL u. OWEN, 1978) zukommen, mit nachfolgender Synthesestörung von Acetylcholin, Lipiden, Proteinen und Ribonukleinsäuren. Eine sekundär gestörte Neurotransmittersynthese (DREYFUS u. PRENSKY, 1967) und eine gestörte Myelinbildung (SILBERBERG, 1969) wurden ebenfalls angeführt. Toxische Metabolite bei der Ahornsirupkrankheit scheinen die BCKAs zu sein, von denen KICA immer den stärksten Effekt zeigte (SNYDERMAN u. Mitarb., 1964; CLARK u. LAND, 1975).

Stoffwechselentgleisungen mit z.T. sehr hohen BCAA- und BCKA-Blutspiegeln treten immer dann auf, wenn der individuelle Toleranzbereich für die BCAAs überschritten wird, sei es durch ihre hohe Zufuhr mit der Nahrung oder durch Katabolismus körpereigenen Gewebes während interkurrenter Erkrankungen und bei unterkalorischer Ernährung. Ihr Auftreten bereits in der Neugeborenenperiode charakterisiert die schwere klassische Form der Ahornsirupkrankheit (Tab. 1). Die Behandlung dieser z.T. lebensbedrohlichen Zustände ist schwierig und zur schnellen Entfernung der verzweigtkettigen Metaboliten können Peritoneal- oder Hämodialyse erforderlich werden (GAULL, 1969; ASTINE u. Mitarb., 1977; HAMMERSEN u.Mitarb., 1978; WENDEL u.Mitarb., 1980). Bei familiärem Risiko für die

Tabelle 1

Formen der MSUD

Klassische Form	K L I N I K	KLINISCH-CHEMISCHE D A T E N	BEHANDLUNG
	Manifestation während der Neugeborenenperiode. Unbehandelt: schwere neurologische Symptomatik: Apathie, Erbrechen, Apnoen, Krämpfe, Coma und Tod. "Maggi"-ähnlicher Geruch des Urins. Trotz diätetischer Behandlung bei interkurrenten Erkrankungen schwere Stoffwechselentgleisungen mit schwerer neurologischer Symptomatik möglich.	Ohne Behandlung und während Stoffwechselentgleisungen sehr hohe BCAA- und BCKA-Blutspiegel (bis 5 mmol/l Leucin und KICA) und hohe Ausscheidung der Metabolite im Urin. KICA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) in Fibroblasten unter 2% der Norm (Gruppe I nach DANCIS u. Mitarb., 1972).	Sehr niedrige Toleranz gegenüber den BCAAs (vorwiegend Leucin), die kaum über dem für Wachstum und Erhaltung notwendigen Bedarf liegt. Deckung des Bedarfs an Protein und essentiellen Aminosäuren durch ein BCAA-freies Aminosäurengemisch (semisynthetische Diät). Während akuter Phasen der Stoffwechselentgleisung Reduktion der BCAAs in der Nahrung. Ggf. Intensivmaßnahmen zur Entfernung der Metaboliten aus dem Körper (Blutaustausch, Peritonealdialyse, Hämodialyse).
Varianten	Schwere bis leichte bis sehr leichte Verläufe	Unbehandelt: Überwiegend normale bis leicht erhöhte BCAA- und BCKA-Blutspiegel. Im Zusammenhang mit Erkrankungen phasenweise mäßig erhöhte Blutspiegel, dann auch Maggeruch des Urins. KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten zwischen 2 und 20% der Norm (Gruppe II und III nach DANCIS u. Mitarb., 1972).	Höhere Toleranz gegenüber den BCAAs als bei der klassischen Form. Proteinreduzierte Diät ausreichend (z.B. 1,5 bis 2,0 g Protein/kg Kp.-Gew. pro Tag) oder Normalkost. Während akuter Phasen mit erhöhten ECAA- und BCKA-Blutspiegeln hochkalorische, BCAA-arme Diät erforderlich.
Intermediate und intermittierende Varianten	Thiamineabhängige Varianten	Senkung der zeitweilig erhöhten BCAA- und BCKA-Blutspiegel und Steigerung der Toleranz gegenüber BCAAs durch pharmakologische Thiamindosen (SCRIVER u. Mitarb., 1971; ELSAS und DANNER, 1976; DURAN u. Mitarb., 1978; PUESCHEL u. Mitarb., 1979). KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten wie bei den anderen Varianten.	Proteinreduzierte Diät und pharmakologische Dosen von Thiamin (10 bis 100 bis 1000 mg/Tag).

Das klinische Spektrum der Varianten ist groß und entspricht der unterschiedlichen Restaktivität der BCKA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) in Fibroblasten der Patienten (DANCIS u. Mitarb., 1972). In diese Gruppe fallen die "intermediate" und "intermittent variants" der MSUD, für deren Abgrenzung es keine klaren Kriterien gibt (SCRIVER und ROSENBERG, 1973). Sonderformen sind durch pharmakologische Thiamindosen beeinflussbar.

klassische Form der Ahornsirupkrankheit muß die Pränataldiagnostik mit der Konsequenz des Schwangerschaftsabbruchs im Falle eines homozygot betroffenen Feten erwogen werden.

Die Einteilung der Ahornsirupkrankheit in mehrere Varianten erfolgt nach klinischen Gesichtspunkten (Tab. 1). Letztlich bestimmt die Höhe der Toleranz eines Patienten gegenüber BCAAs, in erster Linie gegenüber Leucin (SNYDERMAN u.Mitarb., 1964; SCRIVER u.Mitarb., 1976; WENDEL und Mitarb., 1980), den klinischen Verlauf. Die Toleranz geht der Höhe der erblich festgelegten Restaktivität des BCKA-Dehydrogenasekomplexes in den Geweben parallel. Die Übergänge zwischen den Varianten sind fließend, was auf eine größere Zahl von Mutanten für die Enzyme des BCKA-Dehydrogenasekomplexes schließen läßt. Die individuelle Toleranz eines Patienten kann nur im Rahmen der diätetischen Behandlung ermittelt werden, und zwar durch Kontrollen der Blutspiegel der einzelnen BCAAs, wobei eine quantitative Beziehung zur Zufuhr hergestellt wird. Die eigentlich toxischen α -Ketosäuren stehen zu den Aminosäuren im Blut in konstanten Transaminierungsverhältnissen (LANCASTER u.Mitarb., 1974; LANGENBECK u.Mitarb., 1978; WENDEL u.Mitarb., 1980).

Einige frühere Untersuchungen ließen vermuten, daß mehr als eine BCKA-Dehydrogenase für den Abbau der drei verzweigtkettigen α -Ketosäuren existiert (GOEDDE u. KELLER, 1967; CONNELLY u.Mitarb., 1968; BOWDEN u. CONNELLY, 1968), die meisten Ergebnisse deuteten jedoch darauf hin, daß bei der Ahornsirupkrankheit nur ein einziger Multienzymkomplex verändert ist, der immer die oxidative Dekarboxylierung aller drei verzweigtkettigen α -Ketosäuren katalysiert. Ein Enzymkomplex mit konstanter Spezifität gegenüber den drei BCKAs über alle Reinigungsschritte wurde kürzlich von DANNER u.Mitarb. (1979)* aus Mitochon-

*) und PETTIT u.Mitarb. (1978)

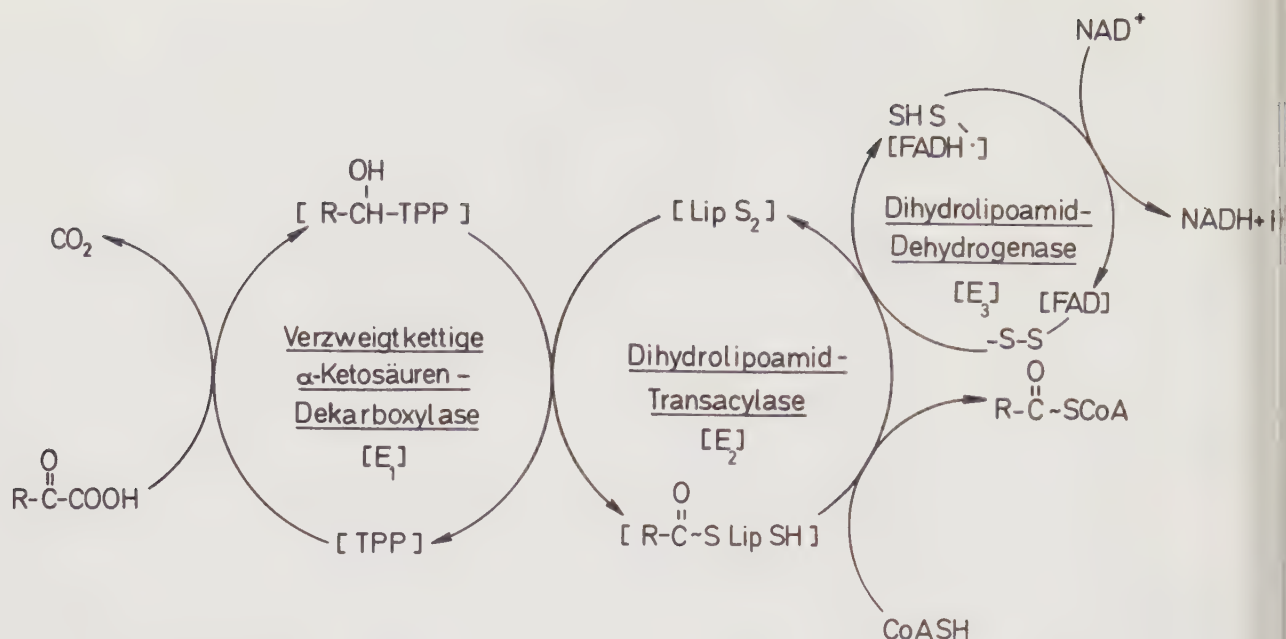


Abb. 2

Reaktionssequenz des BCKA-Dehydrogenasekomplexes

1. α-Ketosäuren-Decarboxylase (E_1):

Decarboxylierung der BCKA und Bindung des decarboxylierten Fragments an TPP, wobei ein "aktiver Aldehyd" ($R-CH(OH)-TPP$ -Komplex) entsteht. Elektronen- und Acylgruppen-Transfer auf eine kovalent gebundene Lipoamid-Gruppe der Transacylase (E_2), wobei TPP wieder frei wird.

2. Dihydrolipoamid-Transacylase (E_2):

Transfer des Acylrests durch die Dihydrolipoamid-Gruppe auf CoASH (Coenzym A) unter Bildung von Acetyl-CoA.

3. Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E_3):

Reoxidation der Dihydrolipoyl-Gruppe der Transacylase durch das Flavoprotein Dihydrolipoamid-Dehydrogenase.

Die "overall"-Oxidation der BCKAs erfordert die Coenzyme TPP, CoASH, NAD^+ und wahrscheinlich Mg^{2+} . Die isolierte BCKA-Decarboxylaseaktivität wird mit $[Fe(CN)_6]^{3-}$ oder DCP als Elektronenakzeptor und TPP als Coenzym gemessen (DANCIS u. LEWITZ, 1978; RÜDIGER u. Mitarb., 1972; LANGENBECK, 1973). Bei der Pyruvat-Decarboxylierung kann auch freier Aldehyd als Elektronen- und Acetylakzeptor fungieren, wobei es zur Bildung von Acetoin kommt (GUNSALUS, 1954; ALKONYI u. Mitarb., 1976).

Die Regulation des BCKA-Dehydrogenasekomplexes ist noch kaum bekannt. Wie bei der Pyruvat-Dehydrogenase könnte eine Aktivierung-Inaktivierung durch Dephosphorylierung-Phosphorylierung bestehen (GUBLER u. MALQUIST, 1979). Außerdem soll Carnitin die BCKA-Oxidation beeinflussen (BREMER u. DAVIS, 1978; PAUL u. ADIBI, 1978).

drien der Rinderleber isoliert und teilweise charakterisiert.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Substrate und Reaktionsprodukte, der Identität der an der Reaktion beteiligten Coenzyme und der Lokalisation der Enzymaktivität an der inneren Mitochondrienmembran ist für diesen Enzymkomplex eine analoge Struktur und Reaktionssequenz wie für die gut charakterisierte Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase anzunehmen (REED u.Mitarb., 1972; HUCHO, 1975; KOIKE u. KOIKE, 1976). Die Zusammensetzung des Komplexes aus drei Apoenzymen und die Reaktionssequenz unter Beteiligung mehrerer Coenzyme sind in Abb. 2 dargestellt. Ähnlich wie für die BCKA-Dehydrogenase existieren genetische Defekte auch für andere α -Ketosäure-Dehydrogenasekomplexe: für die Pyruvat-Dehydrogenase (BLASS u.Mitarb., 1970; FARRELL u.Mitarb., 1974; ROBINSON u. SHERWOOD, 1975; BLASS u. Mitarb., 1976; STRÖMME u.Mitarb., 1976; WENDEL u.Mitarbeiter, 1978) und für die α -Ketoadipat-Dehydrogenase (PRZYREMBEL u.Mitarb., 1975; WENDEL u.Mitarb., 1975; WILSON u.Mitarb., 1975). Das dritte Teilenzym (Dihydrolipoamid-Dehydrogenase) ist identisch für verschiedene Dehydrogenasekomplexe. Bei einem Patienten mit reduzierter Aktivität dieses Teilenzyms waren der Pyruvat-, α -Ketoglutarat- und BCKA-Metabolismus gleichzeitig gestört (ROBINSON u.Mitarb., 1977; TAYLOR u.Mitarb., 1978).

Bei der klinischen Vielfalt der Ahornsirupkrankheit - aber auch schon wegen der komplexen Enzymstruktur - darf man eine Heterogenität des mutierten Genotyps annehmen. Sogenannte Homozygote für MSUD könnten bei nicht blutsverwandten Eltern in Wirklichkeit "genetic compounds", Träger zweier verschiedener mutierter Allele, sein (SCRIVER u. ROSENBERG, 1972). Eine gegenüber der

Norm reduzierte Gesamtaktivität des Enzymkomplexes kann durch unterschiedlich veränderte Apoenzyme, gestörte Coenzym -Apoenzym-Interaktionen sowie durch eine gestörte Zusammenlagerung der Einzelkomponenten zum Gesamtkomplex bedingt sein. Die biochemische Identifizierung des mutierten Genprodukts innerhalb des Enzymkomplexes ist nicht annähernd so weit gediehen wie z.B. für Störungen der Pyruvatoxidation (BLASS u. Mitarb., 1975) oder des Propionatmetabolismus (ROSENBERG, 1978). Ihre Kenntnis könnte Aufschluß über die Zahl der Gen-Loci für den BCKA-Dehydrogenasekomplex geben.

Einen Rückschluß auf den molekularen Defekt innerhalb des Enzymkomplexes ließen weder die Bestimmung der Restaktivität der BCKA-Dekarboxylierung intakter Fibroblasten (DANCIS u. Mitarb., 1972), noch Komplementierungsanalysen in Heterokaryonen verschiedener MSUD-Fibroblastenlinien (LYONS u. Mitarb., 1973) zu. Durch Untersuchungen der BCKA-Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrienmembranen aus Fibroblasten von zwei Patienten mit sogenannter Thiamindependenten MSUD (SCRIVER u. Mitarb., 1971; ELSAS u. DANNER, 1976) kamen DANNER u. Mitarb. (1978b) zu dem Schluß, daß TPP eine enzymstabilisierende Wirkung auf den Komplex hat (DANNER u. Mitarb., 1975; DANNER u. Mitarb., 1978a). Sie postulierten, daß bei diesen Varianten der Defekt, bei normaler Coenzym- und Substratbindung der Dekarboxylase-Einheit (E_1), entweder auf eine abnorme Aggregation der Apoenzyme im Komplex, auf eine Abnormität im zweiten Teilenzym des Komplexes oder auf eine verminderte Zahl normal funktionierender Dekarboxylase-Einheiten (E_1) zurückgeführt werden muß. Auf Enzymebene konnte bei diesen klinisch Thiamin-dependenten Formen eine gestörte Apoenzym-Coenzym-Interaktion nicht nachgewiesen werden.

Für eine andere MSUD-Zelllinie (klassische Form) konnte durch Rekonstitution der BCKA-Dehydrogenaseaktivität in zerstörten Fibroblasten mit Coenzymen (DANNER u.Mitarb., 1975) ein Defekt für die zentral im Komplex gelegene Transacylase(E_2) wahrscheinlich gemacht werden. In einem Fall von klassischer MSUD postulierten RÜDIGER u.Mitarb. (1972) einen Defekt der Dekarboxylase(E_1) durch Untersuchungen teilgereinigten Leberenzym mit DCP als Elektronenakzeptor.

Eigene Untersuchungen und Fragestellung

Die Untersuchungen am BCKA-Dehydrogenasekomplex wurden im wesentlichen mit intakten Fibroblasten durchgeführt. Der Einsatz intakter Zellen ist für bestimmte biochemische Fragestellungen in diesem Fall notwendig, weil der Gehalt der Zellen an BCKA-Dehydrogenaseaktivität sehr viel geringer als der anderer vergleichbarer mitochondrialer Enzyme (Pyruvat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, ROBINSON u.Mitarb., 1977; TAYLOR u.Mitarb., 1978; DANNER u.Mitarb., 1979) ist; außerdem kommt es bei der Freisetzung des Enzymkomplexes aus den Mitochondrien zu einem Total- oder Teilverlust der katalytischen Aktivität (eigene Untersuchungen, WOHLHUETER u. HARPER, 1970; DANCIS u.Mitarb., 1972; RÜDIGER u.Mitarb., 1972c; DANNER u. ELSAS, 1975; DANNER u.Mitarb., 1979). Aus diesem Grund sind Fehlinterpretationen leicht möglich. Obwohl Enzymparameter bei Messungen mit intakten Fibroblasten nicht direkt zu erhalten sind, können diese als Modell für peripheres, extrahepatisches Gewebe Einblicke in den BCAA- und BCKA-Stoffwechsel vermitteln, der gewisse Rückschlüsse

auch auf veränderte Eigenschaften der BCKA-Dehydrogenase bei MSUD zuläßt.

Die Arbeit gliedert sich in vier Abschnitte, die in sich geschlossen sind und die sich folgenden Themen widmen:

- A: Untersuchungen zur BCAA- und BCKA-Dekarboxylierung intakter Fibroblasten und Amnionzellen.
- B: Untersuchungen zur Pränataldiagnostik der MSUD.
- C: Untersuchungen zur Lokalisation des genetischen Defekts im BCKA-Dehydrogenasekomplex der Leber bei MSUD.
- D: Untersuchungen zum Stoffwechsel (Transport, Transaminierung und Dekarboxylierung) von KICA und Leucin in Fibroblasten von Normalpersonen und Patienten mit MSUD.

A: Untersuchungen zur BCAA-, BCKA-Dekarboxylierung in
Fibroblasten und Amnionzellen

EINLEITUNG

Für die Diagnose der Ahornsirupkrankheit, die sich des Nachweises erhöhter BCAA- und BCKA-Spiegel in den Körperflüssigkeiten bedient, ist eine Kenntnis des vorliegenden Enzymdefekts primär nicht relevant. Eine Diagnostik bei normalen Metabolitkonzentrationen wie unmittelbar nach der Geburt, die Pränataldiagnostik, sowie die biochemische Differenzierung einzelner Formen der MSUD muß aber auf der Ebene des veränderten Enzyms erfolgen.

Menschliche Fibroblasten, in eingeschränktem Maße auch Leukozyten, sind geeignete Materialien für Enzymuntersuchungen, da sich in ihnen die BCKA-spezifische Dehydrogenase befindet. Der spezifische Enzymdefekt wurde in Leukozyten und Fibroblasten durch DANCIS u.Mitarb. (1960) zum ersten Mal nachgewiesen. Dieser Befund wurde mehrfach bei den verschiedenen Varianten der MSUD bestätigt (DANCIS u.Mitarb., 1963a; DANCIS u.Mitarb., 1963b; SEEGMILLER u. WESTALL, 1967; SCHULMAN u.Mitarb., 1970; DANCIS u.Mitarb., 1969; GOEDDE u.Mitarb., 1970).

Enzymuntersuchungen in Leukozyten (GOEDDE u.Mitarb., 1964; DANCIS u.Mitarb., 1965) und Fibroblasten (DANCIS u.Mitarb., 1965; LANGENBECK u.Mitarb., 1971; McKNIGHT u. SPENCE, 1972) fanden auch bei der MSUD Einsatz für eine Heterozygoten-Testung. Aber wie auch mit anderen Methoden, konnten Normalpersonen von heterozygoten Genträgern nur unsicher abgegrenzt werden (LANGENBECK, 1973; LANGENBECK u.Mitarb., 1975) und die Daten reichen nicht aus für eine genetische Beratung bei dieser Erbkrankheit.

Da Amnionzellen in Kultur (DANCIS u.Mitarb., 1961) BCKA-Dehydrogenaseaktivität enthalten, konnte das Vorkommen des spezifischen Enzymdefektes in diesem Zelltyp erwartet werden. Die Pränataldiagnostik einer MSUD wurde seit 1968 mit Hilfe von Amnionzellkulturen versucht (DANCIS u.Mitarb., 1968).

Für diese rein diagnostischen Belange, benutzten die verschiedenen Autoren als Maß für die Aktivität der BCKA-Dehydrogenase die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus einer am Carboxyl-C-Atom (C_1 -Atom) radioaktiv markierten BCAA oder BCKA. Als Beispiel seien die Methoden von GOEDDE u.Mitarb. (1970) und von DANCIS u.Mitarb. (1973) genannt. Dabei wurden große Mengen intakter Leukozyten oder Fibroblasten als Enzymquelle eingesetzt. Damit erschien diese Methode, zumindest für die Pränataldiagnostik, die mit möglichst geringen Mengen kultivierter Amnionzellen auskommen muß, nicht geeignet. Ebenso wenig war dazu ein Enzymtest geeignet, der sich zerstörter Zellen bediente (ELSAS u.Mitarb., 1974), weil er als Ausgangsprodukt ebenfalls große Zellmengen benötigte.

Für die Pränataldiagnostik und für biochemische Studien an Zellen von Patienten mit MSUD wurde deshalb ein Mikrotestverfahren entwickelt (WENDEL u.Mitarb., 1973).

Materialien und Methodik:

Zellkultur:

Die Kultur menschlicher Fibroblasten erfolgte nach Standardmethoden mit Hilfe von sterilem Plastikmaterial (Falcon, Nunc). Kulturmedium war MEM (Minimum essential medium Eagle, Flow, Bonn) pH 7,2, das 20 mmol/l HEPES,

14% (v/v) fetales Kälberserum (Flow, Bonn) sowie Penicillin und Streptomycin enthielt. Das Medium wurde im Luftgleichgewicht verwendet.

Die Fibroblasten stammten entweder von Kindern mit MSUD, von Kindern mit solchen angeborenen Stoffwechseldefekten, die keine Beziehung zu den verzweigt-kettigen Aminosäuren haben, oder von Normalpersonen (erwachsene Freiwillige). Sie entstammten unterschiedlichen Kulturpassagen und waren z.T. vorübergehend in flüssigem Stickstoff in Ampullen (Medium und 10% (v/v) DMSO*) eingefroren. Screening auf Mykoplasmabefall der Zellen erfolgte fluoreszenzoptisch mit DAPI** (RUSSEL u.Mitarb., 1975) oder durch Untersuchung der Kulturen mit selektiven Nährböden (Landesimpfanstalt Düsseldorf).

Materialien:

Radioaktiv markierte Aminosäuren und Pyruvat wurden von Amersham (England) und NEN (USA) bezogen. Radioaktiv markierte verzweigt-kettige α -Ketosäuren wurden aus den markierten Aminosäurenanalogen nach der Methode von MEISTER (1957), modifiziert nach RÜDIGER u. Mitarb. (1972a), hergestellt und vor Verwendung nur ein bis wenige Tage bei -80°C gelagert. Natriumsalze der unmarkierten α -Ketosäuren (KICA, KIVA und MEVA) stammten von Sigma, München; Pyruvat von Boehringer, Mannheim; PBS (Dulbecco-Modifikation) von SERVA, Heidelberg. TPP, Coenzym A (freie Säure oder Lithiumsalz) und NAD, in jeweils reinsten Form, wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

*DMSO = Dimethylsulfoxid

**DAPI= 4,6-Diamidino-2-phenylindol (SERVA, Heidelberg)

Die Scintillationsflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung: 1,6 l Toluol, 0,8 l Äthanol, 9,6 g PPO* und 0,24 g POPOP**. Außerdem wurde Instagel (Packard) benutzt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Tricarb C 2425 Scintillations-spectrometer (Packard). Die Ausbeute lag dem Scintillator entsprechend, bei 75 bis 85%.

BCKA-Dekarboxylierung in intakten Zellen

10.000 bis 30.000 Fibroblasten (in Einzelexperimenten auch weniger) wurden mit 0,2 ml Kulturmedium in die Vertiefungen einer Terasaki-Mikrotestplatte (96 Vertiefungen, Falcon) subkultiviert. Während 18-stündiger Inkubation entstand ein konfluenter Zellmonolayer, der bei 2-maligem Spülen mit warmer physiologischer Kochsalzlösung am Boden haften blieb. Der Monolayer wurde mit 0,1 ml eines frisch bereiteten Testgemisches inkubiert. Das Testgemisch wurde den Testanforderungen entsprechend variiert, es bestand im einfachsten Falle zur Messung der BCKA-Dekarboxylierung mit Leucin als Ausgangssubstrat aus 90 µl PBS, das 1% Glucose enthielt, und 25 oder 10 nmol [$1-^{14}\text{C}$]-markierter BCAA in 10 µl wässriger Lösung. Andere Ansätze enthielten 20% (v/v) gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiertes fetales Kälberserum (Seromed).

Wurden α -Ketosäuren als Substrate benutzt, so wurde der Puffer durch Zusatz von 20 mmol/l HEPES und mit NaOH auf pH 6,9 eingestellt. Wurde eine höhere Substratkonzentration angestrebt, so wurden konstant 2,5 bis 5 nmol markierte Substanz mit unterschiedlichen Mengen der unmarkierten Substanz kombiniert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde dann aus dem gemessenen $^{14}\text{CO}_2$ und dem Verhältnis von markierter zu unmarkierter Substanz

*PPO = 2,5-Diphenyloxazol

**POPOP = 2,2'-p-Phenyl-bis-5-phenyloxazol

berechnet. Die genaue Zusammensetzung der Testgemische findet sich jeweils in den Legenden zu den Abbildungen und Tabellen. Bei der Messung der Substratdekarboxylierung mit intakten Zellen enthielt das Testgemisch keine Coenzyme.

Während der Inkubation der Platten bei 37°C wurde das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ in mit 3,5 normaler NaOH (ca. 20 μl) getränkten Glasfaserplättchen (Durchmesser 10 mm; Milipore, Neuhausen), über den Vertiefungen angebracht, gesammelt. Nach Inkubationsende wurden die Plättchen in Scintillationsflüssigkeit überführt, und nach 8-stündiger Lagerung bei 4°C wurde die Radioaktivität gemessen. Als Blindwert diente der Spontanzerfall des Substrats im Inkubationsgemisch ohne Zellen. Die Blindwertestiegen mit der Lagerungsdauer der $[1-^{14}\text{C}]$ -Ketosäuren (in saurer, wässriger Lösung bei -80°C) an, blieben aber bei den markierten BCAAs trotz Lagerung unverändert niedrig.

Für die Proteinbestimmung wurde der Zellmonolayer in alkalischem Milieu lysiert (50 μl einer 2,5 molarer NaOH mit anschließender Neutralisierung durch HCl). In dieser Lösung erfolgte die Proteinbestimmung nach der LOWRY-Methode (LOWRY u. Mitarb., 1951), modifiziert für kleine Volumina. Eichkurven wurden mit Rinderalbumin angelegt. Bei der Proteinbestimmung betrug der Variationskoeffizient ($V = \text{S.D.} \times 100/\bar{x}$) 7 bis 10%. Der Proteingehalt pro Einzelansatz lag im allgemeinen unter 20 μg . Messungen waren bis minimal 1 μg möglich. 3.000 Zellen ergaben etwa 1 μg Zellprotein.

Ergebnisse und Diskussion:

Fibroblasten bilden eine relativ homogene Zellpopulation, die in ihrem Vitalitätszustand gut zu charakterisieren ist. Sie sind deshalb für enzymatische Unter-

Tabelle 2

KICA- und KIVA-Dekarboxylierung in Fibroblasten

Zelllinien	(pmol $^{14}\text{CO}_2/\mu\text{g}$ Zell- protein x 4h)		% der normalen Aktivität	
	KICA	KIVA	KICA	KIVA
Kontrollen (N=21)				
($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	12,4 $\pm$ 2,6	14,9 $\pm$ 4,0	100	100
<u>MSUD</u>				
SS	0,97	0,74	7,8	5,0
HG	0,59	0,59	4,7	4,0
AR	0,55	0,40	4,4	2,7
KQ	0,51	0,39	4,1	2,6
CC	0,52	0,38	4,2	2,5
KG	0,62	0,52	4,9	3,5
SL	0,46	0,29	3,7	2,0
KC	0,23	0,29	1,8	2,0
AG	0,23	0,10	1,8	0,7

Testgemisch: 20 μl fetales Kälberserum (äquibriert mit PBS +0,4% Glucose an Sephadex G-10) sowie 80 μl PBS +0,4% Glucose. Substratkonzentration: $5 \times 10^{-5} \text{ mol/l} \pm 5\%$ $[1-^{14}\text{C}]$ KICA (spezif. Radioaktivität 55 mCi/mmol) oder $[1-^{14}\text{C}]$ KIVA (spezif. Radioaktivität 37,5 mCi/mmol). Das Testgemisch war mit 20 mmol/l HEPES und NaOH auf pH 6,9 eingestellt. Inkubation bei 37°C . Blindwerte: 4,5 pmol $^{14}\text{CO}_2/4\text{h}$ (KICA) bzw. 3,5 pmol $^{14}\text{CO}_2/4\text{h}$ (KIVA). Mittelwerte jeweils 4 Bestimmungen.

KG, SL, KC, AG stammen von Patienten mit klassischer MSUD, die anderen Zelllinien stammen von MSUD-Varianten (Aus: WENDEL u.Mitarb., 1975).

Tabelle 3

KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten (Ausgangssubstrat: Leucin)

Zelllinien	pmol $^{14}\text{CO}_2/\mu\text{g}$ Zell- protein x 3h	% der normalen Aktivität
Kontrollen (N=18)* ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	3,3 $\pm$ 0,8	100
<u>MSUD</u> (klassische Form)		
MOR (Fet)	0,02 - 0,04	~ 1
BAU (Fet)	0,01 - 0,03	< 1
AG	0,01	< 1
PUR	0,04	1,2
SOR	0,03	< 1
TAV	0,03	< 1
ENG	0,04	1,2
<u>MSUD</u> (Varianten)		
MOR	0,08	2,5
GÜN	0,31	9
TEI	0,43	13
KUB	0,53	17
NYA	0,62	19

Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l L-[1- ^{14}C]Leucin.
Testgemisch: PBS + 1% Glucose.

*) Gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten als Kontrollen zu den MSUD-Zelllinien. Zum Teil wurden die Zelllinien mehrfach untersucht.

Die Restaktivität der BCKA-Dekarboxylierung in MSUD-Fibroblasten mit Leucin als Ausgangssubstrat entsprach dem Schweregrad des klinischen Verlaufs. Sie lag jeweils in den von DANCIS u. Mitarb. (1972) für die klassische Form und die Varianten angegebenen Bereichen, auch wenn die verwendete geringe Leucinkonzentration die Messung von optimalen Enzymaktivitäten der Zellen nicht zuließ. Die optimale Leucinkonzentration lag nach DANCIS u. Mitarbeitern (1972) bei 1,67 mmol/l.

suchungen besser geeignet als Leukozyten. Die im Mikrotest mit Fibroblasten gewonnenen Ergebnisse ließen sich auf Amnionzellen in der Kultur direkt übertragen und waren für die Entwicklung der Prä-nataldiagnostik für Ahornsirupkrankheit unerlässlich.

Die enzymatische Dekarboxylierung von $[1-^{14}\text{C}]$ -markierter KICA und KIVA (Tab. 2) und von L- $[1-^{14}\text{C}]$ Leucin nach Transaminierung zu KICA (Tab. 3) in intakten Fibroblasten und Amnionzellen war ein Maß für die BCKA-Dehydrogenaseaktivität der Zellen.

Wegen der Instabilität radioaktiver α -Ketosäuren (von KORFF, 1964; WILLEMS u.Mitarb., 1978), vorwiegend im alkalischen Milieu, wurde im relativ sauren Bereich (pH-Wert 6,9) getestet. Dadurch konnte die Spontandekarboxylierung (Leerwert) der $[1-^{14}\text{C}]$ -markierten α -Ketosäuren niedrig gehalten werden, sie betrug aber dennoch bis zu 5 pmol/4 h Inkubation. Bei Einsatz von $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin als Substrat (pH 7,2 bis 7,4) betrug diese nur 0,3 bis 0,7 pmol/4 h. Aufgrund des geringen Blindwertes und der größeren Stabilität der käuflichen $[1-^{14}\text{C}]$ -markierten BCAAs erschien der Einsatz von Leucin als Substrat für die reine Diagnostik geeignet. Für den Leucinabbau in Fibroblasten war die Dekarboxylierung der α -Ketosäure und nicht die Leucin-Transaminierung zur Ketosäure der geschwindigkeitslimitierende Schritt (s.S. 70).

Die Testbedingungen mit L- $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin als Substrat (Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l) sind in Abb. 3 und 4 dargestellt.

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der KICA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) mit Fibroblasten und Amnionzellen. Die Dekarboxylierung war in den ersten 90 Minuten geringer als später. Nach Extrapolation des

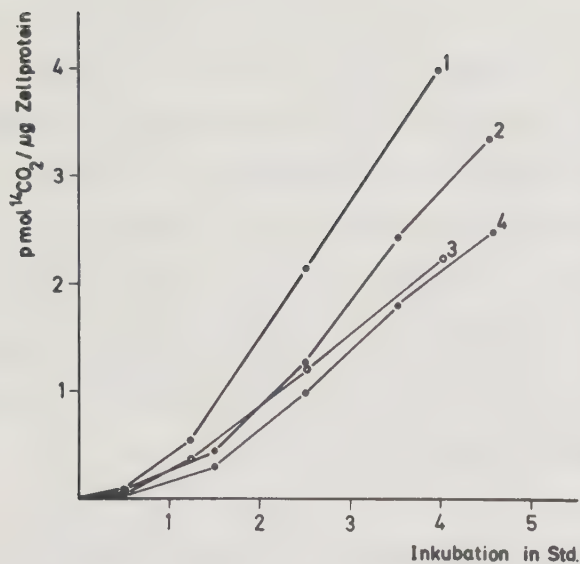


Abb. 3

Zeitlicher Verlauf der KICA-Dekarboxylierung (Ausgangssubstrat: Leucin) mit Fibroblasten und Amnionzellen.

Amnionzellen (1,2,4); Fibroblasten (3). Normalkontrollen. Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin. Zellprotein für die einzelnen Linien zwischen 5 und 20 μg .

Der Leerwert stieg während der 1. Std. auf 0,7 pmol an und blieb während der folgenden 4h praktisch konstant.

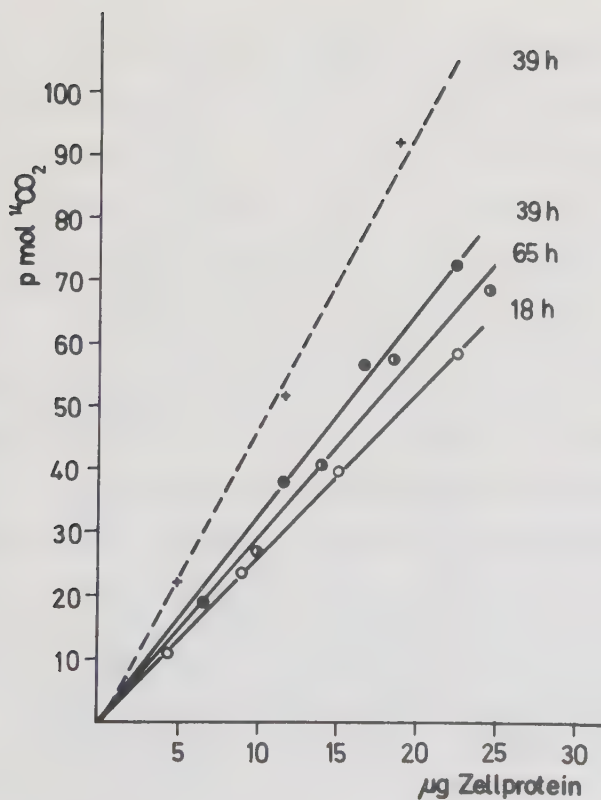


Abb. 4

KICA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) mit Fibroblasten in Abhängigkeit vom Zellprotein.

Die Angaben in Stunden beziehen sich auf die Zeiträume, während der die Zellen, nach Subkultivierung auf die Testplatten, vor Messung der Dekarboxylierung wuchsen. Bei Testung nach 65 Std. erfolgte ein Mediumwechsel nach 36 Std.

Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin.

Inkubation: 4 Std.

In anderen Experimenten war die Dekarboxylierung linear zum Zellprotein von 1,2 bis 10 μg .

Reaktionsbeginns auf die 60. Minute reichte eine Messung aus, und man konnte eine lineare Reaktion über 5 Stunden annehmen. Die Ursache für die anfangs verzögerte Dekarboxylierungsrate (geringe Temperatur, noch fehlende Konstanz der Substratkonzentration am Ort des Enzyms, Zeitdauer bis zur Herstellung eines Gleichgewichts zwischen dem $^{14}\text{CO}_2$ des Inkubationsmediums und der Gasphase) wurde nicht aufgeschlüsselt. Ein zeitlich identischer Verlauf wurde bei der Dekarboxylierung anderer Substrate mit intakten Zellen gefunden.

Für Fibroblasten und Amnionzellen war die Dekarboxylierungsrate linear zum Zellprotein bis zu 25 μg (Abb. 4). Die spezifische Aktivität der Dekarboxylierung variierte mit der Dauer der Subkultur der Zellen auf der Platte vor Testung (Abb. 4).

Die intraindividuelle Variation ($V = \text{S.D.} \times 100/\bar{x}$) der KICA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) in 21 parallel durchgeführten Tests betrug bei Einsatz einer konstanten Zellzahl 13%, bei Einsatz unterschiedlicher Zellmengen 20%. Die Dekarboxylierung mit den Ausgangssubstraten KICA und Leucin variierte in nicht parallel durchgeführten Tests, mit Zellen aus der gleichen Subkultur in unterschiedlich konfluenten Stadien (an fünf aufeinanderfolgenden Tagen) zwischen 15% und 30%. Die interindividuelle Variation betrug in einer Serie von 21 normalen Zelllinien (unterschiedlicher Subkultur), gemessen innerhalb von 2 Monaten in 5 unabhängigen Tests mit KICA 21% und mit KIVA 26%. Entsprechende, aber auch höhere interindividuelle Variationen (24-33%), wurden mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin als Substrat gefunden.

Die in Tab. 2 aufgeführten Messungen der KICA- und KIVA-Dekarboxylierung von Fibroblasten wurden bei einer sehr geringen Ketosäurekonzentration ($5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) durchgeführt. Eine Unterscheidung zwischen normalen Zellen und Zellen von MSUD-Patienten gelang nur bei geringer Substratkonzentration; höhere Ketosäurekonzentrationen im Test waren, wie spätere Untersuchungen zeigen (s.S. 53), nicht zur Unterscheidung von MSUD-Zellen und Normalkontrollen geeignet. Im Gegensatz dazu war eine Diskriminierung zwischen Normalkontrollen und defekten Zellen mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin bei jeder Konzentration möglich. In dieser Hinsicht war die Untersuchung der Zellen mit Leucin sicherer als mit Ketosäuren, eine Diskrepanz, auf die auf S. 76 eingegangen wird.

Bei einer Leucinkonzentration von $0,1 \text{ mmol/l}$ im Testansatz wurden nur 60 bis 65% der optimalen Dekarboxylierungsrate intakter Zellen erreicht (Abb. 5). Ein Optimum der Dekarboxylierungsfunktion mit Leucin als Ausgangssubstrat liegt erst oberhalb der Sättigungskonzentration, bei etwa $1,5 \text{ mmol/l}$ vor (s. Abb. 5; DANCIS u. Mitarb., 1977). Der Einsatz von $0,1 \text{ mmol/l}$ Leucin ist gerechtfertigt, da unter diesen Bedingungen wegen der sehr hohen spezifischen Radioaktivität des $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucins eine gesteigerte Testempfindlichkeit resultiert. Diese läßt eine starke Reduktion des Zellmaterials im Test zu.

Die Restaktivitäten der BCKA-Dekarboxylierung (% der mittleren normalen zellulären $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung) verschiedener MSUD-Zelllinien (klassische Form und Varianten) gemessen mit $[1-^{14}\text{C}]$ -markierten α -Ketosäuren lagen niedriger als die von DANCIS u. Mitarb. (1972) angegebenen, mit Leucin ($1,67 \text{ mmol/l}$ Substratkonzentration) erstellten Werte und ließen eine klare Abstufung, dem

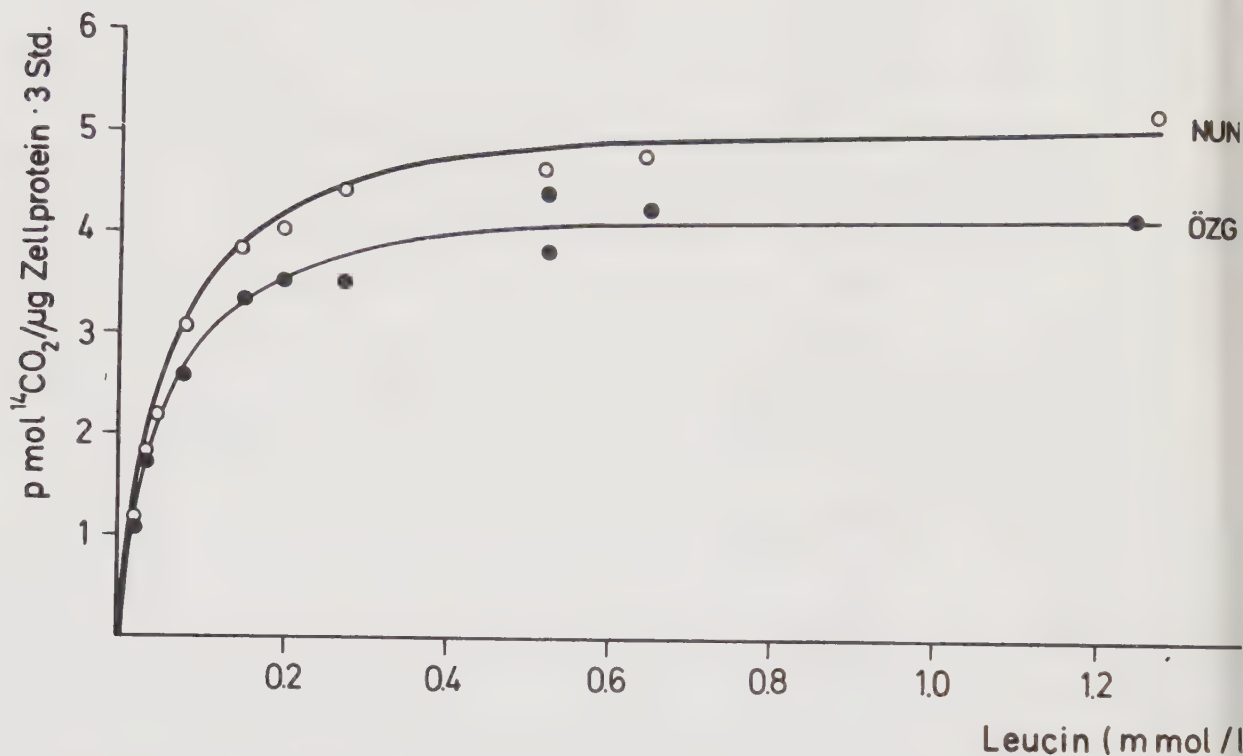


Abb. 5

KICA-Dekarboxylierung (L-[1-¹⁴C]-Leucin als Ausgangssubstrat) in Fibroblasten in Abhängigkeit von der Leucinkonzentration. Bei der extrazellulären Leucinkonzentration von 0,1 mmol/l sind etwa 65% der optimalen Aktivität erreicht. Der apparente Km-Wert für die Funktion liegt bei 5×10^{-5} mol/l.

klinischen Verlauf entsprechend, vermissen Tab. 2); die eigenen, mit [1-¹⁴C]-Leucin gemessenen Werte entsprachen aber diesen (Tab. 3). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Inkubationsansätze nicht vergleichbar waren, da

eine große Unsicherheit bei der Wahl der Ketosäurekonzentration für diese Untersuchung bestand. Die Messung der Restaktivität eines Enzyms sollte bei Substratsättigung erfolgen. Bei vorgegebener extrazellulärer Konzentration von KICA oder Leucin wird die intrazelluläre Konzentration am Ort des Enzyms aber durch Membrantransport der Substanzen, Transaminierung und Kompartimentierung bestimmt, so daß man wahrscheinlich nicht unter optimalen Bedingungen messen kann. Bei der Untersuchung intakter Zellen gehen außer bei identischer Methodik zu viele Faktoren ein, als daß man eine absolute Vergleichbarkeit der Ergebnisse erwarten kann.

Diese hier geschilderte Mikromethode benötigt nur 0,6 - 1% des Zellmaterials bisher benutzter Testmethoden (LANGENBECK u.Mitarb., 1971; DANCIS u.Mitarb., 1972, 1973). Sie hat den zusätzlichen Vorteil, daß die Zellen bei der Untersuchung vital sind.

Die KICA-Dekarboxylierung der intakten Zellen (mit KICA und Leucin als Ausgangssubstrat) als korrespondierende Aktivität der BCKA-Dehydrogenase unterliegt im Mikrotest einer erheblichen Beeinflussung, die jedoch von biochemischen Untersuchungen mit Fibroblasten in Kultur bekannt sind. Sie dürfte auch vom Zellzyklus der Fibroblasten abhängen. Von Einfluß sind das Ausmaß der Konfluenz der Zellen vor ihrer Subkultivierung auf die Platten, die Dauer ihres Wachstums auf der Platte vor der Testung sowie die Kulturpassage. Einen bedeutenden Einfluß dürfte auch die Transaminierungsrate der einzelnen Zelllinien haben.

Trotz der erheblichen Variation waren Normalkontrollen immer von MSUD-Varianten abzugrenzen (Tab. 2 u. 3), und

Zellen von Patienten mit klassischer MSUD wiesen praktisch kaum Dekarboxylierungsaktivität auf. Der Mikrotest ist, wie auch andere Tests, nicht zur Erkennung heterozygoter Genträger geeignet.

Für diagnostische Belange ist wichtig, daß ein Mykoplasmabefall der Zellen, im Gegensatz zu manchen anderen Enzymaktivitäten (CLARK u. Mitarb., 1977), die BCKA-Dekarboxylierung nicht beeinflußt.

B: Untersuchungen zur Pränataldiagnostik

EINLEITUNG

Die Ahornsirupkrankheit kann durch Messung der BCKA-Dekarboxylierung von Amnionzellen pränatal diagnostiziert werden. Versuche zur Diagnostik gab es seit 1968 (DANCIS u.Mitarb., 1968), ein homozygoter Fet für MSUD wurde aber erstmals 1973 (WENDEL u.Mitarb., 1973) diagnostiziert.

Selbst unter optimalen Bedingungen ist die Gewinnung großer Mengen von Zellmaterial in Amnionzellkulturen zeitraubend und die Abkürzung der Zeitspanne zwischen Amniocentese und Diagnosestellung gelingt nur, wenn Mikromethoden mit wenig Zellmaterial zur biochemischen Diagnostik zur Verfügung stehen.

Amnionzellen in der Kultur sind morphologisch heterogen(UHLENDORF, 1970; SUTHERLAND u.Mitarb., 1974; HOEHN u.Mitarb., 1974; v.d.VEER u.Mitarb., 1978) und verhalten sich auch im Wachstum unterschiedlich. Nach HOEHN u.Mitarb. (1974) sind 3 Zelltypen zu unterscheiden. Die Wachstumspotenz der F-("fibroblastoid cells") und der AF-Zellen ("amniotic fluid cells") ist gut und ähnelt der von Fibroblasten, die der E-Zellen ("epitheloid cells") ist geringer, und es besteht eine deutliche Anfälligkeit dieser Zellen bei Subkultivierung (HOEHN u. Mitarb., 1974; SUTHERLAND u.Mitarb., 1974).

Bei biochemischen Tests mit wenig Zellmaterial oder gar mit Einzelzellen (Übersicht bei GALJAARD, 1978) müssen, um Fehldiagnosen zu vermeiden, die biochemischen Parameter in Relation zum untersuchten Zelltyp gewertet werden. Bisherige Untersuchungen zeigten für einige Enzyme weder

in der Subkultur (GERBIE u.Mitarb., 1972) noch in der Primärkultur (v.d.VEER u.Mitarb., 1978) signifikante Unterschiede in der spezifischen Aktivität der verschiedenen Zelltypen.

1978 wies jedoch die Arbeitsgruppe um DANCIS (COX u.Mitarb., 1978) auf Probleme bei der Diagnostik der MSUD in Amnionzellkulturen mit Wachstum von vorwiegend epitheloiden Zellen hin. Diese Gruppe untersuchte mit ihrem Test die BCKA-Dekarboxylierung der Amnionzellen wie die der Fibroblasten mit Zellen in Suspension (DANCIS u.Mitarb., 1972), mit Leucin als Ausgangssubstrat. Das dazu reichlich benötigte Zellmaterial stammte aus konfluenten Kulturen.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob Unterschiede in der KICA-Dekarboxylierung für die einzelnen Amnionzelltypen (AF-, F- und E Zelltyp nach HOEHN u.Mitarb., 1974) bestehen. Außerdem wurde untersucht, ob die Schwierigkeiten, die bei der Diagnostik aufgetreten waren, mit Problemen zusammenhingen, die bei der Kultur großer Zellmengen entstehen, oder ob sie in der benutzten Testmethode(Zellsuspension) begründet sind.

METHODIK:

11 Fruchtwasserproben stammten von Schwangeren mit Risiko für die klassische Ahornsirupkrankheit. Normalkontrollen stammten von Schwangeren, bei denen wegen fortgeschrittenen mütterlichen Alters (über 37 Jahre) eine Pränataldiagnostik durchgeführt wurde. Die Amnioncentese wurde jeweils während der 16. Schwangerschaftswoche in der Universitäts-Frauenklinik, Düsseldorf (Direktor: Prof.Dr.med. L. Beck) durchgeführt. Die Kultur der Amnionzellen erfolgte im Institut für

Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. G. Röhrborn) unter Standardbedingungen. In vier Fällen wurden fertige Kulturen zur Diagnostik aus Prag, Bern, Freiburg und Lyon erhalten. Kulturmedium war Ham's F10-Medium mit 25% fetalem Kälberserum (Flow), Penicillin und Streptomycin im 20% CO₂/80% Luft-Gleichgewicht. In allen Düsseldorfer Fällen mit Risiko für MSUD konnte die biochemische Untersuchung mit Zellen aus der Primärkultur 12 bis 18 Tage nach Amnioncentese durchgeführt werden. Referenz-Amnionzelllinien befanden sich im konfluenten Stadium der späten Primärkultur. Nach Trypsinierung (0,05% Trypsin und 0,02 mM ÄDTA) erfolgte die Subkultivierung der Zellen auf Mikrotestplatten. Die Messung der BCKA-Dekarboxylierung mit [1-¹⁴C]Leucin erfolgte 18 Std. später im Vergleich mit Fibroblasten von Normalkontrollen und MSUD-Patienten sowie mit Amnionzellen von stoffwechselgesunden Feten. Die Substratkonzentrationen sind unter den Ergebnissen angegeben. Zur Kontrolle des Zellstoffwechsels wurde parallel die zelluläre [1-¹⁴C]Pyruvat-Dekarboxylierung gemessen.

Die verschiedenen, nach HOEHN u. Mitarb. (1974) morphologisch charakterisierten Primärklone wurden 9 bis 14 Tage nach Kulturansatz selektiv trypsiniert und auf Mikrotestplatten kultiviert. Die trypsinierten Zellen eines Klons wurden jeweils auf zwei Vertiefungen der Mikrotestplatte verteilt. Die Trypsinwirkung wurde durch Zusatz von Kulturmedium gehemmt. Innerhalb von 30 min hafteten die vitalen Zellen am Boden, und das Trypsin-Medium-Gemisch wurde durch Ham's F10-Medium ersetzt. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach 18 Std. Inkubation. Nach 36 Std. Inkubation wurde der mit physiologischer Kochsalzlösung

gespülte, am Boden haftende Monolayer, untersucht. Maximal 3 bis 4 Klone konnten aus einer Primärkultur entnommen werden.

Das Reaktionsgemisch bestand aus PBS + 1% Glucose, das 1×10^{-4} mol/l L-Leucin (7nmol unmarkiertes und $3 \text{ nmol} \pm 10\% [1-^{14}\text{C}]$ -Leucin enthielt. Die Inkubation dauerte 4 Stunden bei 37°C .

Zur Proteinbestimmung wurden die Zellen nach Inkubationsende (im Reaktionsgemisch) durch Zugabe von 0,2 ml 4%igem NaHCO_3 mit 0,2 molarer NaOH lysiert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach der LOWRY-Methode. Nur Experimente mit einer Zellproteinmenge von mehr als 1 μg wurden berücksichtigt.

Außerdem wurde die spezifische Aktivität der BCKA-De-karboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) von Amnionzellen und Fibroblasten direkt nach Trypsinierung in Suspension und nach Anwachsen im Monolayer (jeweils in Mikrottestplatten) untersucht. Die Amnionzellen stammten aus Primärkulturen, die Fibroblasten aus Subkulturen, jeweils mit konfluentem Zellwachstum. Die Leucinkonzentration im Test betrug 1×10^{-4} mol/l.

Ergebnisse

Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Pränataldiagnostik bei familiärem Risiko für die klassische Form der MSUD. Sie enthält daneben Normalwerte von Fibroblasten und Amnionzellen sowie Werte von Fibroblasten von Patienten mit klassischer MSUD.

Die spezifische Aktivität der Dekarboxylierung mit Leucin als Substrat lag bei der verwendeten geringen Substratkonzentration für normale Amnionzellen und Fibroblasten im gleichen Bereich.

Alle pränatal gestellten Diagnosen wurden entweder mit

Tabelle 4

Pränataldiagnostik der MSUD (klassische Form)

	Zellprotein (μg)	$^{14}\text{CO}_2$ (pmol/ μg Zellprotein $\times 3\text{h}$)	Diagnose
<u>Fälle</u>			
1	15,3	3,51	Normal
2	2,6	0,02	MSUD
3	7,5	2,18	Normal
4	11,6	3,44	Normal
5	2,0	0,01	MSUD
6	8,0	3,80	Normal
7	3,2	2,65	Normal
8	4,4	2,45	Normal
9	4,0	2,03	Normal
10	6,0	2,10	Normal
11	7,0	0,02	MSUD
<u>Kontrollen*</u> ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)			
Amnionzellen (N=17)	0,8-14,1	$2,9 \pm 0,97$	Normal
Fibroblasten (N=20)	3,4-24,5	$2,5 \pm 0,8$	Normal
<u>MSUD*</u>			
Fibroblasten (N=4)	2,5-19,5	0,02-0,05	MSUD

Substratkonzentration: $2,0$ bis $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l [$1\text{-}^{14}\text{C}$] Leucin
(spezifische Aktivität 59 mCi/mmol)

*) Gemessen zu unterschiedlichen Zeiten als Kontrollen zu den Fällen.

(Teilweise publiziert in LANCET, WENDEL u. CLAUSSEN, 1979)

Fibroblasten der fetalen Haut nach Schwangerschaftsabbruch oder durch Geburt eines gesunden Kindes bestätigt. Eine Unterscheidung zwischen normal-homozygoten und heterozygoten Genträgern wurde nicht angestrebt.

Die geringe Konzentration von $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin im Test (mit $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l unterhalb des Km-Wertes für diese Dekarboxylierungsfunktion (s. Abb. 5)) bei hoher spezifischer Radioaktivität (59mCi/mmol) ermöglichte auch bei Einsatz von sehr wenig Zellmaterial eine Abgrenzung der sehr geringen CO_2 -Produktion durch Zellen homozygoter MSUD-Genträger vom Blindwert (0,3pmol). Die Pyruvat-Dekarboxylierung lag für alle Zelllinien im Bereich von 48 bis 135 pmol $\text{CO}_2/\mu\text{g}$ Zellprotein x 3 Std. (Substratkonzentration $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l) und war für Amnionzellen und Fibroblasten ebenfalls gleich hoch.

Die Unterteilung der Amnionzelltypen der Primärklone erfolgte nach HOEHN u. Mitarb. (1974). Bei 34 nicht ausgewählten Klonen aus 12 Primärkulturen war die Verteilung ähnlich, wie sie durch HOEHN angegeben worden war: 66% AF-Zellen, 25% E-Zellen und 9% F-Zellen. In den Kulturen dominierte jeweils ein Zelltyp. Die spezifische Aktivität der Dekarboxylierung betrug für AF-Zellen $3,06 \pm 1,34$ ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$), für E-Zellen $2,66 \pm 1,4$ und F-Zellen $2,21 \pm 0,9$ pmol $\text{CO}_2/\mu\text{g}$ Zellprotein x 3 Std. In Abb. 6 sind die Einzelwerte der Untersuchung (jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) in Beziehung zum eingesetzten Zellprotein dargestellt. Für jeden Einzelwert war ein deutlicher Abstand gegenüber der sehr geringen CO_2 -Produktion durch Zellen von Patienten mit klassischer MSUD vorhanden.

Fibroblasten zeigten bei Testung in Suspension und im Monolayer praktisch identische Werte (Tab. 5). Für Amnionzellen lagen die in Suspension gemessenen Werte der KICA-Dekarboxylierung (mit Leucin als Ausgangssubstrat) aber

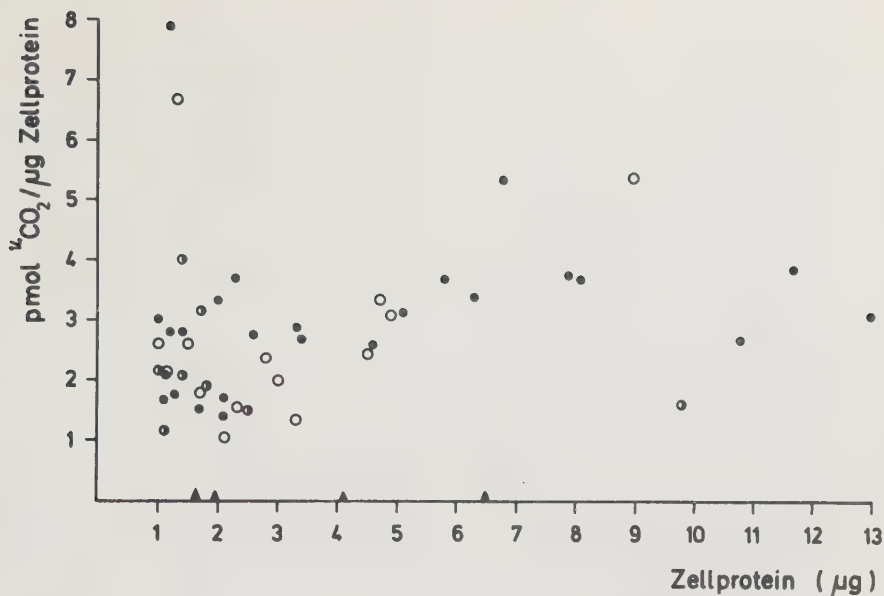


Abb. 6

KICA-Dekarboxylierung durch verschiedene Amnionzelltypen mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin als Ausgangssubstrat.

- AF-Zellen: 14 Klone, $N=25$; $3,06 \pm 1,3$
 - E-Zellen: 9 Klone, $N=17$; $2,66 \pm 1,4$
 - F-Zellen: 6 Klone, $N=8$; $2,21 \pm 0,9$
 - ▲ Fibroblasten, klassische Form der MSUD.
- } pmol $^{14}\text{CO}_2/\mu\text{g}$ Zellpr. x 3h.

Mittelwerte: ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$). Die Unterschiede sind nicht signifikant ($p > 0,05$). Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l $[1-^{14}\text{C}]$ Leucin.

um 82 bis 91% niedriger als bei der Messung im Monolayer. Parallel hierzu betrug die Anwachsrate der Amnionzellen nach Trypsinierung auch nur 10 bis 16%. Amnionzellen und Fibroblasten hatten bei Testung im Monolayer vergleichbare spezifische Aktivitäten der KICA-Dekarboxylierung (Tab. 5). Tabelle 6 zeigt den Vergleich der Pyruvat-Dekarboxylierung durch Fibroblasten und Amnionzellen im Monolayer und in Suspension. Auch hier lag die Anwachsrate der Amnionzellen bei 30%, die der Fibroblasten bei 100%. Wiederum lagen für Amnionzellen die in Suspension gemessenen Werte niedriger als bei Testung im Monolayer. Die Werte für Fibroblasten waren nach beiden Testmethoden gleich hoch.

DISKUSSION

Mit der Mikrotestmethode für die BCKA-Dekarboxylierung intakter Zellen im Monolayer mit Leucin als Ausgangssubstrat konnte in jedem Fall pränatal die richtige Diagnose gestellt werden. Die benötigte Zeit betrug für

Tabelle 5

Vergleich der KICA-Dekarboxylierung (Ausgangssubstrat: Leucin) in Fibroblasten und Amnionzellen in Suspension und im Monolayer

	A: Suspension		B: Monolayer	
	Protein (μg)	$^{14}\text{CO}_2$ (pmol/ $\mu\text{g} \times 3\text{h}$)	Protein (μg)	$^{14}\text{CO}_2$ (pmol/ $\mu\text{g} \times 3\text{h}$)
<u>FIBROBLASTEN</u>				
ST	23,9	5,85	23,5	7,79
FM	18,6	3,01	13,9	4,05
BD	14,5	4,23	13,5	7,79
TJ	11,5	2,93	9,3	2,82
<u>AMNIONZELLEN</u>				
962	31,2	0,92	4,6	6,25
965	30,9	0,34	3,2	3,83
966	34,8	0,71	5,6	4,04

Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l L-[1- ^{14}C]-Leucin. Testung auf Mikrottestplatten.
Anwachsrate der Zellen: Differenz zwischen Protein A und B.

Tabelle 6

Vergleich der Pyruvatdekarboxylierung von Fibroblasten und Amnionzellen in Suspension und im Monolayer

Zelllinie	A: Suspension		B: Monolayer		
	Protein	$^{14}\text{CO}_2$	Protein		$^{14}\text{CO}_2$
	(μg)	($\text{pmol}/\mu\text{g} \times \text{h}$)	(μg)	(μg)	($\text{pmol}/\mu\text{g} \times \text{h}$)
			C	D	
Fibroblasten	257,5	32,0	10,3	11,9	27,0
Amnionzellen	262,5	14,2	10,5	3,7	24,2

Die Untersuchung der Zellen in Suspension erfolgte nach der Methode von WILLEMS, 1978. Inkubationsmedium: 1 ml PBS. Substratkonzentration: $2,1 \times 10^{-4}$ mol/l [$1-^{14}\text{C}$]-Pyruvat. Die Werte lagen in der von WILLEMS angegebenen Höhe.

Die Untersuchung der Zellen im Monolayer erfolgte in der Mikrottestplatte (0,1 ml PBS) bei identischer Substratkonzentration. Apparenter Km-Wert der Pyruvatdekarboxylierung mit intakten Fibroblasten: $1,1 \times 10^{-4}$ mol/l (eigene Ergebnisse; WILLEMS, 1978). Anwachsrate der Zellen: Differenz der Proteinmenge von C (Protein der Zellen, die in die Plattenvertiefungen gegeben wurden) und D (Protein der Zellen, die 18 Std. später den Monolayer bildeten).

Kultur und Testung 12 bis 20 Tage und entsprach der Zeitspanne, die heute auch für eine cytogenetische Analyse der Amnionzellen benötigt wird. Ein geringes Zellwachstum bereitete keine Probleme, es reichten minimal 2 bis 3 junge Primärklone für einen Test mit Mehrfachbestimmung aus (ca. 6.000 Zellen für eine Doppelbestimmung). Konfluenz der Zellen war weder in der Primärkultur noch während des Tests erforderlich.

Es konnte gezeigt werden, daß der untersuchte Amnionzelltyp - wenn die Zellen nur metabolisch aktiv waren - keinen signifikanten Einfluß auf das Testergebnis hatte. Die KICA-Dekarboxylierung (Leucin als Ausgangssubstrat) als korrespondierende Aktivität der BCKA-Dehydrogenase verhielt sich damit wie andere Enzyme in Amnionzellen. Immer bestand eine große Variabilität hinsichtlich der spezifischen Enzymaktivität für Zellen eines Typs, die auch von den Testbedingungen abhängig war (v.d.VEER u. Mitarb., 1978). Die Argininbersteinsäure-Lyaseaktivität war in epitheloiden Amnionzellen sehr viel geringer als in fibroblastoiden Zellen (FLEISHER u.Mitarb., 1979); über signifikante Unterschiede der spezifischen Enzymaktivitäten wurde nur bei Histidase (Aktivität lokalisiert in epitheloiden Amnionzellen) und bei Cystathioninsynthase (Aktivität fastausschließlich in fibroblastoiden Amnionzellen) berichtet (MELANCON u.Mitarb., 1971; GERBIE u.Mitarb., 1972).

Epithelbide Amnionzellen besitzen von den drei Zelltypen die kürzeste replikative Lebensdauer. Der Verlust an vitalen und auch zur Proliferation befähigten Zellen während der Subkultivierung scheint für diesen Zelltyp besonders groß zu sein (HOEHN u.Mitarb., 1974). Unter diesem Aspekt wäre für diesen Amnionzelltyp eine möglichst frühe biochemische Untersuchung anzustreben. Wegen

des limitierten Zellmaterials ist dann eine empfindliche Mikromethode unentbehrlich.

Der Vergleich der KICA-Dekarboxylierung von Amnionzellen in Suspension (Methode von DANCIS u.Mitarb., 1972) und im Monolayer (eigene Untersuchungen) demonstriert noch einmal, daß biochemische Untersuchungen mit Zellen in der Primärkultur (MORROW u.Mitarb., 1976) oder aus der Primärkultur (ELSAS u.Mitarb., 1974) ohne genaue Kenntnis ihres Vitalitätszustandes fehlerhafte Ergebnisse liefern können. In konfluenten Primärkulturen ist wahrscheinlich ein großer Teil der Amnionzellen metabolisch inaktiv oder tot, oder er verliert durch Trypsinierung die Fähigkeit zum normalen Metabolismus. Die Zellen haften dann nach Subkultivierung nicht am Boden und proliferieren nicht. Der Verlust metabolischer Funktionen scheint bei mechanischer Lösung der Zellen von ihrer Unterlage noch größer zu sein als bei Einsatz von Trypsin (COX u.Mitarb., 1978; ELSAS u.Mitarb., 1974).

Da in jeder Primärkultur mitklonalem Wachstum die Zellproliferation von wenigen Zentren ausgeht, sind bei hoher Teilungsrate der Zellen ab einer bestimmten Klongröße erhebliche Alterungsprozesse in dessen zentralem Anteil zu erwarten. Das gilt auch für konfluente Primärkulturen. In der Primärkultur dürfte somit trotz guter Zellproliferation der Zuwachs an für biochemische Untersuchungen brauchbaren Zellen relativ gering sein.

Bei der Vorbereitung der Zellen für den beschriebenen Mikrottest findet während der Subkultivierung auf die Mikrottestplatte und durch das Spülen des Zellrasens vor dem Test eine Selektion der Zellen statt: nur vitale Zellen befinden sich schließlich im Monolayer der jungen Subkultur, der untersucht wird und ein

Maximum an aktiven Zellen wird auf diese Weise erzielt. Die Mikromethode selbst ist empfindlich genug, um kleinste Mengen vitaler Zellen nach Subkultivierung zu erfassen. Das Minimum der benötigten Zellzahl wird eher durch die Ungenauigkeit der Proteinbestimmung unterhalb von 1 µg Zellprotein limitiert. Insgesamt ist der hier beschriebene Test übersichtlich, sicher und genauer, als der Test von DANCIS u.Mitarb. (1973), bei dem viele Zellen in Suspension untersucht werden.

Diese Mikromethode in Testplatten wurde inzwischen von anderen Arbeitsgruppen zur Pränataldiagnostik übernommen (KLEIJER u.Mitarb., 1975; FENSOM u.Mitarb., 1978). Sie läßt sich analog, durch Messung einer Substrat-Dekarboxylierung, bei der Diagnostik der Isovalerianacidämie und des Pyruvat-Dehydrogenase-Mangels (WENDEL u.Mitarb., 1975) nutzen und durch Quantifizierung des Einbaus radioaktiver Substrat-Spaltprodukte in Zellprotein bei der pränatalen Diagnostik von Defekten im Propionatmetabolismus (MORROW u.Mitarb., 1976; eigene unveröffentlichte Ergebnisse) und der Argininsuccinurie (FLEISHER u.Mitarb., 1979) anwenden.

C: Untersuchungen zur Lokalisation des genetischen Defekts im BCKA-Dehydrogenasekomplex der Leber bei MSUD

EINLEITUNG

In Analogie zum Pyruvat-Dehydrogenasekomplex, für den genetische Defekte der Dekarboxylase(E_1)- und der Transacetylase(E_2)-Einheit bekannt sind (BLASS u. Mitarb., 1975), könnte der molekulare Defekt bei der MSUD grundsätzlich auch die ersten beiden Teilenzyme des BCKA-Dehydrogenasekomplexes betreffen.

Das dritte Teilenzym ist identischer Bestandteil aller α -Ketosäuren-Dehydrogenasen (ROBINSON u. Mitarb., 1977; TAYLOR u. Mitarb., 1978) und dürfte deshalb bei der MSUD nicht gestört sein.

Bisher wurde in 3 Fällen von MSUD versucht, den Defekt innerhalb des BCKA-Dehydrogenasekomplexes zu lokalisieren: einmal war wahrscheinlich das Dekarboxylase-Teilenzym(E_1) (RÜDIGER u. Mitarb., 1972), in 2 Fällen das Transacetylase-Teilenzym(E_2) betroffen (DANNER und ELSAS, 1975; DANNER u. Mitarb., 1978b).

Es wird in der vorliegenden Arbeit über Messungen der Aktivität des BCKA-Dehydrogenase-Gesamtkomplexes und des BCKA-Dekarboxylase-Teilenzym(E_1) in postmortal entnommener Leber eines Patienten mit klassischer MSUD berichtet. Zum Vergleich wurden diese Aktivitäten in postmortal entnommener Leber von Kindern ohne BCKA-Abbaufekt und in 3 Lebern von Feten aus der 20. Schwangerschaftswoche gemessen. Von den Feten waren zwei homozygot für die MSUD. In den drei Fällen von MSUD wurde auch die Ketosäure-Dekarboxylierung in intakten Fibroblasten untersucht, um die Befunde von Leber und Fibroblasten vergleichen zu können.

Material und Methodik

Die Aktivität des BCKA-Dehydrogenasekomplexes* wurde in Leberhomogenat nach der Methode von WOHLHUETER und HARPER (1970), die der BCKA-Dekarboxylase*(E₁) mit Ferricyanid*⁺ nach einer modifizierten Methode von REED u. WILLMS (1966) gemessen. Gemessen wurde dabei die Dekarboxylierung von radioaktiv markierter α -Ketosäure

1. im Rahmen des durch Cofaktoren stimulierten vollständigen Reaktionsablaufs am BCKA-Dehydrogenasekomplex,
2. durch das funktionell isolierte Dekarboxylase-Teilenzym

Die Entnahmebedingungen des Lebergewebes sind in der Tabelle 7 angegeben. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. In einigen Fällen ging dieser Aufbewahrung eine 1 bis 2 Monate dauernde Lagerung bei -80°C voraus. Bei der Lagerung im flüssigen Stickstoff verlor das Gewebe innerhalb eines Jahres nicht an Enzymaktivität.

BCKA-Dehydrogenase

Die Leber wurde unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben und anschließend zu einem 10 bis 30%igen (g/v) Homogenat mit eiskaltem Tris-Puffer (50 mmol/l Tris-HCl + 0,2 mmol/l ÄDTA, pH 7,0) im Potter-Elvehjem verarbeitet. Der Überstand des Homogenats wurde nach 10 Minuten dauernder Zentrifugation bei 600 x g für die Untersuchungen verwendet. Das Reaktionsgemisch enthielt 138 mmol/l Kaliumphosphat (pH 7,2), 0,2 mmol/l ÄDTA, 0,2 mmol/l TPP, 3,3 mmol/l NAD, 1,65 mmol/l CoASH, 3,3 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l Dithiothreitol, 3,3 mmol/l Na₂CO₃, [1-¹⁴C]KICA oder [1-¹⁴C]KIVA in unterschiedlichen Konzentrationen und 50 μ l

-
- *) Als BCKA-Dehydrogenase wird hier der gesamte Enzymkomplex bezeichnet, der bei Stimulation mit Cofaktoren (TPP, CoASH, NAD) die Gesamtreaktion der oxidativen Dekarboxylierung katalysiert. Die BCKA-Dekarboxylase(E₁) wird für den ersten Schritt der Gesamtreaktion gebraucht der durch Verwendung von Ferricyanid als Elektronenakzeptor vom weiteren Reaktionsablauf abgetrennt ist.
- *⁺) Ferricyanid wird als Kurzform für Hexacyanoferrat (III) benutzt.

Tabelle 7

Charakterisierung des untersuchten Lebergewebes

Probanden	Alter	Krankheit	Zeitp. d. Entnahme
<u>Normal-kontrollen</u>			
OLG	3 Mon.	Nichtketotische Hyperglycinämie, eitrige Meningitis	sofort n.d.Tode
HEB	13 Mon.	Methylmalonacidurie	4 Std.n.d.Tode
PRI	3 Mon.	Hirndegeneration unbekannter Genese	sofort n.d.Tode
SCA	3 Tage	Hypoplastisches Linksherz, Schock, Laktatacidose	sofort n.d.Tode
JEM	12 Mon.	muskulärer Carnitinmangel	sofort n.d.Tode
Fet.JAC	20.SSW	Mucopolysaccharidose	sofort nach dem Ausstoßen d.Feten
<u>MSUD</u>			
PUR*	18 Mon.	MSUD (klassische Form)	sofort n.d.Tode
Fet.BAU	20.SSW	MSUD (klassische Form)	sofort nach dem Ausstoßen d.Feten
Fet.MOR	20.SSW	MSUD (klassische Form)	sofort nach dem Ausstoßen d.Feten; auf Trockeneis von Bern geschickt

Das Lebergewebe stammte meist von Patienten mit erblichen Stoffwechseldefekten. Vor dem Tode bestanden z.T. über unterschiedlich lange Zeitspannen Stoffwechselentgleisungen mit organischen Acidämien, Acidosen und protrahiertem Schock. Die Schwangerschaftsabbrüche erfolgten jeweils in der 20.Schwangerschaftswoche mit Prostaglandinen.

Leber von JEM wurde 48 Std., die von PUR 2 bis 4 Wochen nach dem Tode getestet. Das andere Lebergewebe lagerte bis zur Testung 2 bis 12 Monate in flüssigem Stickstoff.

*) Krankheitsverlauf ausführlich beschrieben bei HAMMERSEN u.Mitarb. (1978) und WENDEL u.Mitarb. (1980).

Leberhomogenat (entsprechend 0,8 bis 2,5 mg Protein). Das Endvolumen betrug 0,3 ml, die Inkubation 10 min bei 34°C. Bei der Messung von Enzymkinetiken wurde die Menge an $[1-^{14}\text{C}]$ KICA oder $[1-^{14}\text{C}]$ KIVA im Einzeltest jeweils konstant gehalten (0,11 bis 0,23 $\mu\text{Ci}/\text{Testansatz}$), und die Substratkonzentration wurde durch Zufügen steigender Mengen der entsprechenden nichtmarkierten Substanz variiert. Das jeweilige Verhältnis von markiertem zu nichtmarkiertem Substrat wurde bei der Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{pmol CO}_2 / \text{mg Protein} \times 10 \text{ min}$) aus dem tatsächlich gemessenen $^{14}\text{CO}_2$ zugrundegelegt.

Inkubation

Die vorgewärmten Anteile des Inkubationsgemisches wurden in 2 ml-Plastikröhrchen gemischt, und die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat gestartet. Diese Plastikröhrchen befanden sich in gläsernen Scintillationsgefäßen in einem Schüttelbad. Die Scintillationsgefäße wurden sofort nach Start der Reaktion mit einer Gummikappe luftdicht verschlossen. Die Reaktion wurde durch Injektion von 0,2 ml einer 1-molaren Perchlorsäurelösung oder Essigsäure durch die Gummikappe in das innere Reaktionsgefäß beendet. Gleichzeitig wurde 0,5 ml Hyaminhydroxid 10x (1-molare Lösung in Methanol, PACKARD) in das Scintillationsgefäß gegeben. Das während der Reaktion freigesetzte CO_2 wurde innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur durch Hyaminhydroxid absorbiert. Nach Entnahme des inneren Reaktionsgefäßes wurde dem Hyaminhydroxid 10 ml Scintillationsflüssigkeit zugesetzt und die akkumulierte Radioaktivität wurde gemessen.

BCKA-Dekarboxylase(E_1)

Lebergewebe wurde unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben und in Saccharose-Lösung (0,25 mol/l) homogenisiert. Ein 20 bis 50%iges (g/v) Homogenat wurde her-

gestellt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand im Verhältnis 1:1 mit Puffer verdünnt (12 mmol/l MgCl_2 in 0,1 molarem Kaliumphosphat, pH 6,0). Das Reaktionsgemisch enthielt 67 mmol/l Kaliumphosphat (pH 6,0), 4 mmol/l MgCl_2 , 18 mmol/l $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,18 mmol/l TPP sowie 100 μl Leberhomogenat (entsprechend 0,5 bis 3,0 mg Protein). Das Endvolumen betrug 0,3 ml. Inkubiert wurde 10 min bei 34°C . Der Testablauf war wie oben beschrieben.

Cofaktoren und Ferricyanid wurden für jede Untersuchung frisch angesetzt und bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt. Für die Blindwerte (= Spontandekarboxylierung der Ketsäuren) diente der zur Homogenisierung verwendete Puffer anstelle des Leberhomogenats. Gekochtes Leberhomogenat oder Zusatz von Rinderalbumin beeinflusste den Blindwert nicht. Er betrug in beiden Testansätzen mit frisch hergestellter $[1-^{14}\text{C}]\text{KICA}$ oder $[1-^{14}\text{C}]\text{KIVA}$ 0,03 bis 0,05 nCi. Die Proteinbestimmung erfolgte mit verdünntem Leberhomogenat nach der LOWRY-Methode.

Zur Entfernung des bei MSUD pathologisch angereicherten Substrats wurde das Homogenat des Patienten PUR (der Patient verstarb mit Plasmaspiegeln für Leucin und KICA um 1,3 mmol/l) vor der Testung über eine Sephadex G-10 Säule (Durchmesser 1 cm, 10 cm lang, Sephadex in Homogenatpuffer, Säulenpassage bei 4°C) gegeben. Dadurch verlor das Leberhomogenat von Normalkontrollen 40% seiner Enzymaktivität. Dagegen betrug der scheinbare Aktivitätszuwachs bei PUR 40 bis 50%.

In beiden Testansätzen verlief die Reaktion linear zur Inkubationsdauer bis 40 min und zum eingesetzten Protein zwischen 0,5 und 3 mg. Nach Inkubation des Homogenats bei 60°C (10 min) war in keinem Falle mehr Enzymaktivität vorhanden.

Die Enzymaktivitäten wurden in nmol CO²/mg Protein x 10 min angegeben. 1 mg Protein im Leberhomogenat entsprach etwa 18 mg Frischgewebe. Den Berechnungen lagen Mittelwerte von Doppel- oder Dreifachbestimmungen zugrunde. Zur Berechnung der Enzymkonstanten wurden die Einzelwerte in LINEWEAVER-BURK (1/v vs. 1/s) -Diagrammen (LINEWEAVER u. BURK, 1934) eingetragen. Die Berechnung der linearen Regressionen (nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate) und die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit den Achsen wurden mit einem TI-Programable 57 Rechner (Texas-Instruments) durchgeführt.

Ergebnisse

Die Tab. 8a zeigt den Effekt der Coenzymsubstitution (TPP, CoA, NAD) auf die Dekarboxylierung von [1-¹⁴C] KICA in Leberhomogenat. Zur Rekonstitution der BCKA-Dehydrogenaseaktivität waren sämtliche Coenzyme erforderlich. Die gewählten Coenzymkonzentrationen entsprachen etwa dem 100-fachen der apparenten Km-Werte für den BCKA-Dehydrogenasekomplex aus Rattenleber (PARKER u. RANDLE, 1978) und Rinderleber (ELSAS, pers. Mitteilung). Die BCKA-Dekarboxylaseaktivität im Ferricyanid-Test wurde durch TPP stimuliert (Tab. 8b), der Zusatz von NAD und Coenzym A zu diesem Testsystem stimulierte die Aktivität nicht weiter (Daten nicht aufgeführt).

Die Abb. 7a zeigt Kinetiken der BCKA-Dehydrogenase mit KICA im Leberhomogenat des Patienten PUR (klassische MSUD) und von zwei Normalkontrollen mit ungestörter BCKA-Oxidation. In jedem Falle ergaben sich monophasische Enzymkinetiken (Abb. 7b). Die apparenten Km-Werte betrugen $2 - 5 \times 10^{-5}$ mol/l für KICA und für KIVA (HEB u. PUR). Die spezifische Enzymaktivität im Leberhomogenat des MSUD-Patienten PUR war deutlich gegenüber der Norm vermindert (Tab. 9). KIVA wurde etwas schneller umgesetzt als KICA.

Tabelle 8a

Rekonstitution der Aktivität der BCKA-Dehydrogenase in Leberhomogenat

Homogenat ohne Cofaktoren	0,34 pmol/mg x 10 min
Homogenat + MgCl ₂ , TPP	0,69 pmol/mg x 10 min
Homogenat + NAD, CoASH	0,83 pmol/mg x 10 min
Homogenat + NAD, CoASH, MgCl ₂ , TPP	1,07 pmol/mg x 10 min

Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l [$1-^{14}\text{C}$]-KICA

Tabelle 8b

Rekonstitution der Aktivität der BCKA-Dekarboxylase(E₁) in Leberhomogenat

Homogenat + MgCl ₂	0,34 pmol/mg x 10 min
Homogenat + MgCl ₂ , TPP	0,54 pmol/mg x 10 min
Homogenat + MgCl ₂ , K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,060 pmol/mg x 10 min
Homogenat + MgCl ₂ , TPP, K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,072 pmol/mg x 10 min

Substratkonzentration: 1×10^{-4} mol/l [$1-^{14}\text{C}$]-KICA

Werte aus zwei unabhängigen Untersuchungen mit Leberhomogenat des Patienten HEB.

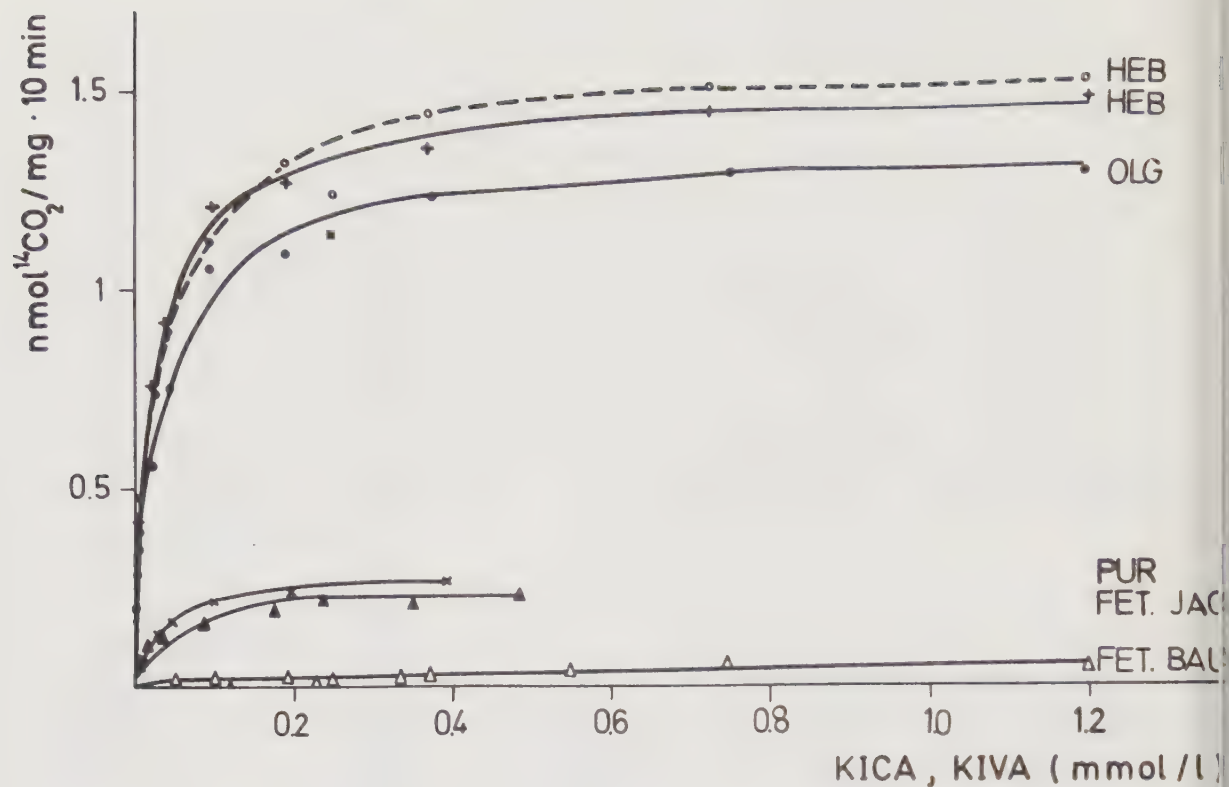


Abb. 7a

Kinetiken der BCKA-Dehydrogenase mit KICA (—) und KIVA (---) in Leberhomogenat von Normalkontrollen (HEB, OLG), einem normalen Feten (FET JAC), einem MSUD-Patienten (PUR) und einem für MSUD homozygoten Feten (FET BAU).

Bei identischem K_m -Wert war die spezifische Aktivität der Leber eines Feten ohne Aminosäurestoffwechseldefekt mit nur 5-10% der Normalwerte im Säuglingsalter auffallend gering; noch deutlich niedriger lag die spezifische Aktivität in fetaler Leber der homozygoten Genträger für MSUD (Fet BAU, Fet MOR). Wahrscheinlich war in diesen beiden Fällen der K_m -Wert 10-fach höher als in allen anderen Proben; auf eine genaue Analyse der Daten wurde wegen der Ungenauigkeit der Messung bei sehr geringer Enzymaktivität verzichtet.

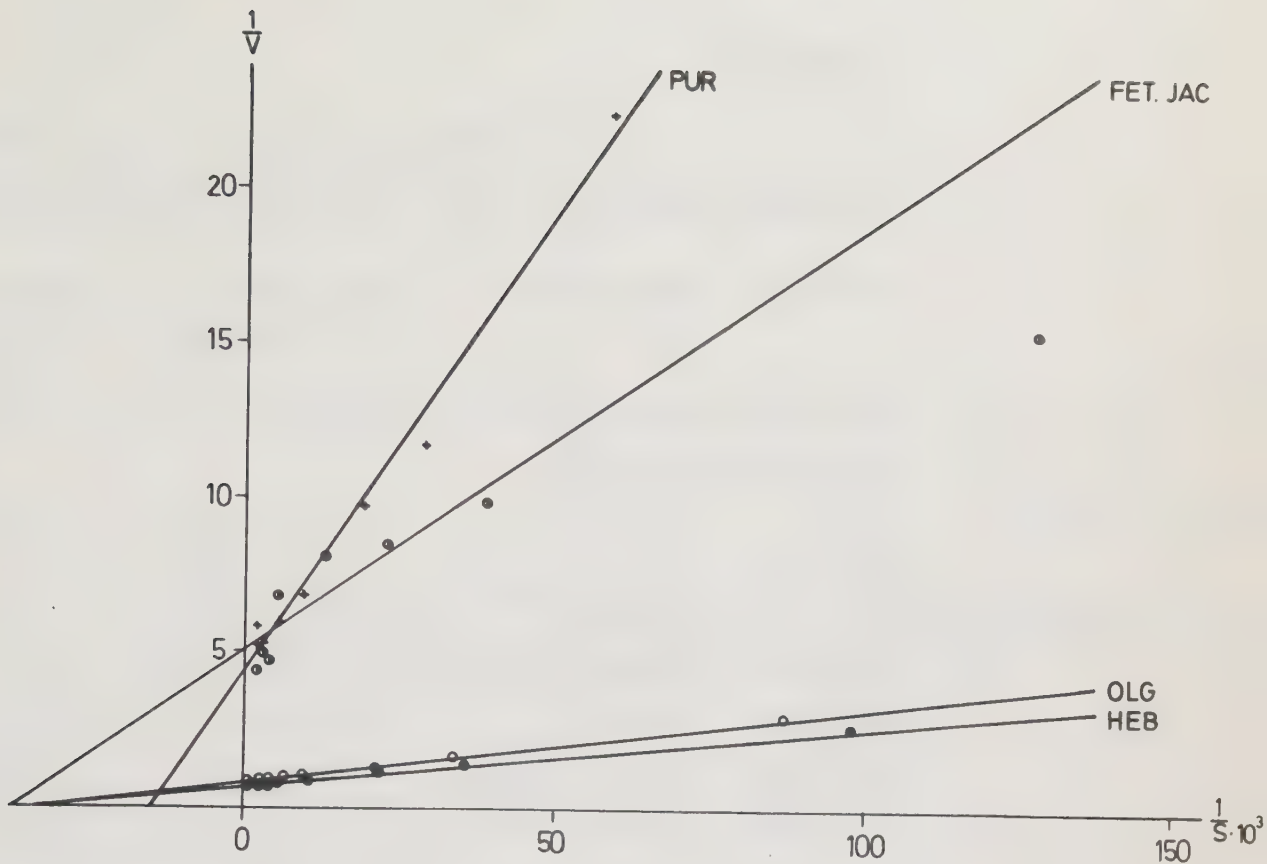


Abb. 7b

LINEWEAVER-BURK Diagramm der BCKA-Dehydrogenase mit KICA (doppelt reziproke Auftragung der Werte aus Abb. 7a). Die optimalen Regressionslinien wurden nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechnet. Die Enzymkonstanten sind in Tab. 9 aufgeführt.

In den Abbildungen 8a u. b sind die gleichen Parameter für die BCKA-Dekarboxylase dargestellt. Annähernde Substratsättigung war für dieses Teilenzym im Gegensatz zur BCKA-Dehydrogenase erst bei etwa 10-fach höherer Substratkonzentration erreicht. Auch diese Enzymkinetiken waren sämtlich monophasisch. (Vergleich der Daten in der Tab. 9).

In der Tab. 10 wurden die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme verglichen (Substratkonzentration bei der BCKA-

Tabelle 9

Enzymkonstanten der BCKA-Dehydrogenase und BCKA-Dekarboxylase in Leberhomogenat verschiedener Probanden

Proband	(Substrat)	apparente Km (mol/l)	apparente Vmax (nmol CO ₂ /mg Protein x 10min)
<u>BCKA-Dehydrogenase</u>			
HEB	(KICA)*	3,0-4,8x10 ⁻⁵	1,50-1,60
HEB	(KIVA)	2,7 x 10 ⁻⁵	1,46
OLG	(KICA)	3,3 x 10 ⁻⁵	1,32
PUR	(KICA) <u>MSUD</u>	6,7 x 10 ⁻⁵	0,23
FET JAC	(KICA)	2,7 x 10 ⁻⁵	0,20
FET BAU	(KICA) <u>MSUD</u>	} 10-30-fach höher, Bereich von 10 ⁻⁴	~ 0,05
FET MOR	(KICA) <u>MSUD</u>		~ 0,05
<u>BCKA-Dekarboxylase</u>			
HEB	(KICA)	8,6 x 10 ⁻⁴	0,53
PRI	(KICA)	5,4 x 10 ⁻⁴	0,26
PUR	(KICA) <u>MSUD</u>	7,4 x 10 ⁻⁴	0,40
FET MOR	(KICA) <u>MSUD</u>	5,0 x 10 ⁻⁴	~ 0,05

*) HEB (KICA): Mehrfachbestimmungen.

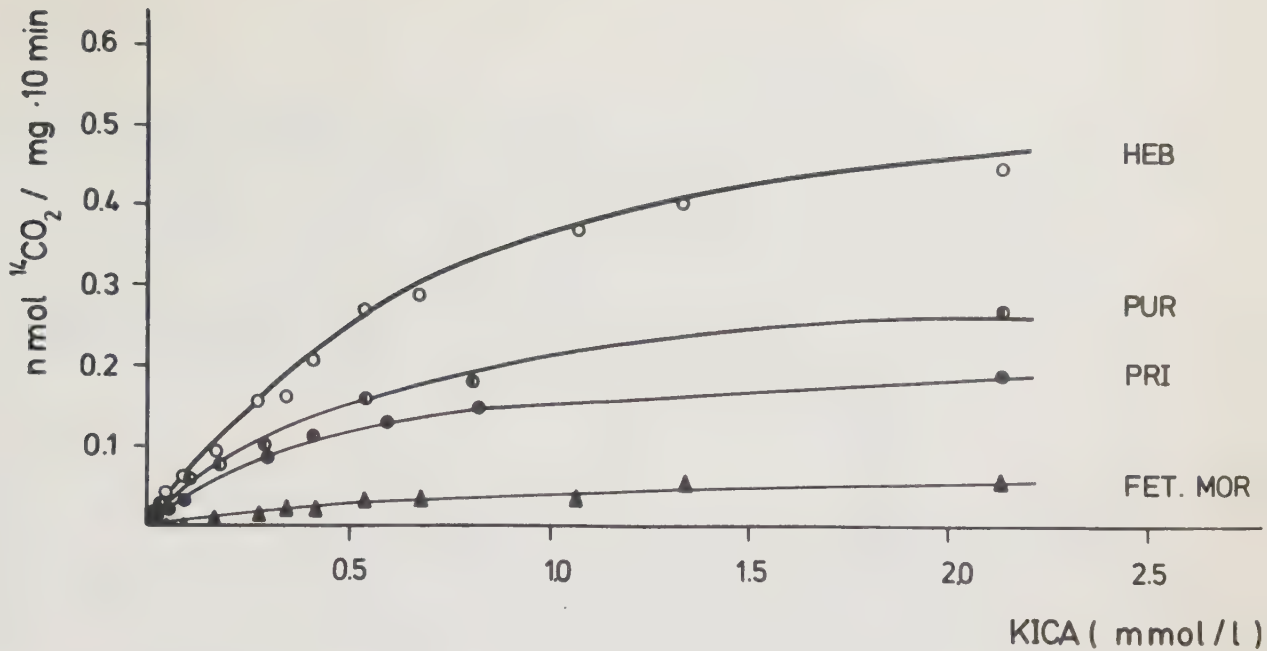


Abb. 8a

Kinetiken der BCKA-Dekarboxylase mit KICA in Leberhomogenat von Normalkontrollen (HEB, PRI), einem MSUD-Patienten (PUR) und einem für MSUD homozygoten Feten (FET. MOR).

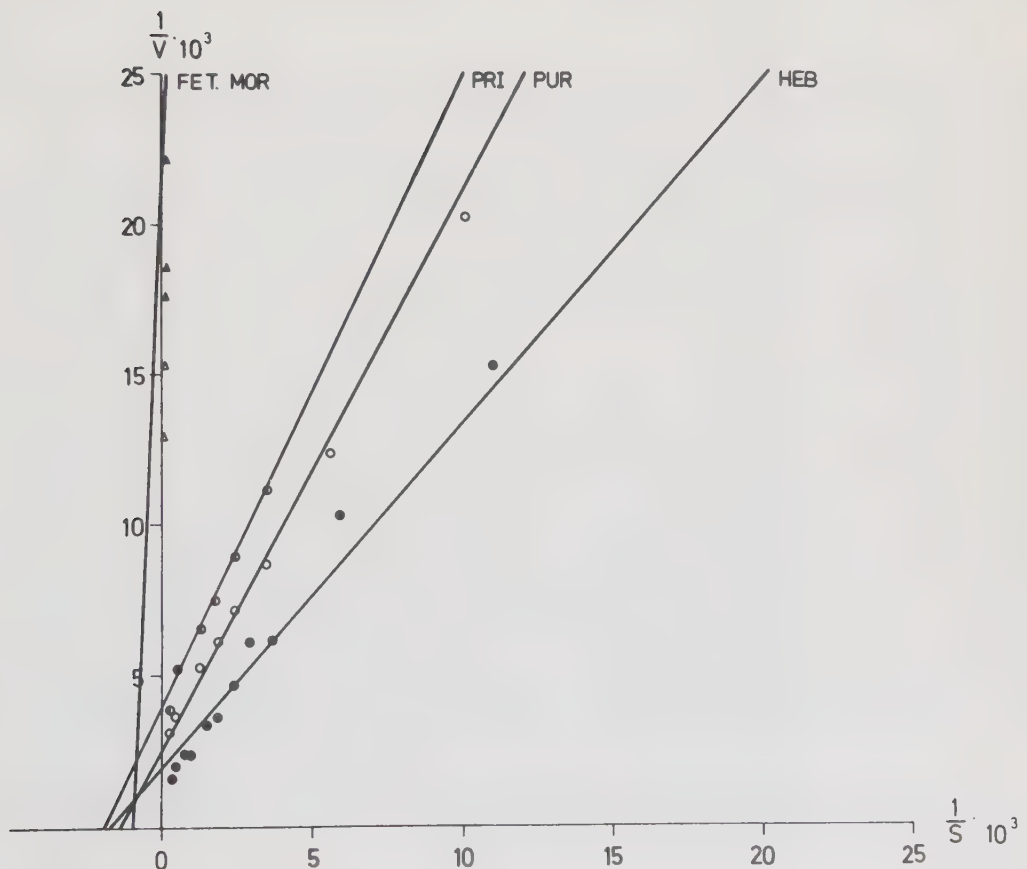


Abb. 8b

LINEWEAVER-BURK Diagramm der BCKA-Dekarboxylase mit KICA (doppelt-reziproke Auftragung der Werte aus Abb. 8a).

Tabelle 10

Vergleich der spezifischen Aktivität der BCKA-Dehydrogenase und BCKA-Dekarboxylase in Leber von MSUD-Patienten und Normalkontrollen.

Proband	BCKA-Dehydrogenase (pmol CO ₂ /mg x min)	BCKA-Dekarboxylase
<u>Normalkontrollen</u>		
OLG	130	nicht gemessen
PRI	nicht gemessen	20,0
HEB	177,1	37,5
SCA	130,7	nicht gemessen
JEZ	226,7	20,9
<u>MSUD</u>		
PUR	20	25,9
FET MOR	4,4	2,6

Substratkonzentration bei Testung der Dehydrogenase:
 $3,5 \times 10^{-4}$ mol/l [1-¹⁴C] KICA, bei Testung der Dekarboxylase:
 $1,5 \times 10^{-3}$ mol/l [1-¹⁴C] KICA. Inkubation: 10 min bei 34°C.

Die Messungen erfolgten in insgesamt 4 unabhängigen Tests. Bei Mehrfachuntersuchungen der Leber des Probanden HEB wurden etwa identische Werte gemessen.

Die BCKA-Dehydrogenaseaktivität in Leber von Normalkontrollen berechnet sich auf 7,2-12,5 nmol/CO₂/g Gewebe x min. Zum Vergleich: TAYLOR u.Mitarb. (1978): 12,2-19,4 nmol CO₂/g Gewebe x min in postmortal entnommener und eingefrorener Leber. Die Leber stammte von Kindern, die nach akuten und chronischen Krankheiten verstorben waren.

KHATRA u.Mitarb. (1977): $35,0 \pm 7,8$ nmol CO₂/g Gewebe x min ($\bar{x} \pm S.E.M.$) in postmortalen Leber. Die Leber wurde 4 Std. nach dem Tode entnommen und sofort (ohne Einfrieren) gemessen. $21,3 \pm 1,0$ nmol CO₂/g Gewebe x min in frischen, durch Biopsie gewonnenen Leberproben und 7,5-14,7 ($9,8 \pm 1,3$) nmol CO₂/g Gewebe x min in cirrhotischer, nicht eingefrorener Leber. Substratkonzentration: $> 1 \times 10^{-3}$ mol/l KICA. Die Substratkonzentration zur Testung der Dehydrogenase lag in diesen eigenen Versuchen mit dem etwa 6-10-fachen des Km-wertes nahezu im Bereich des Aktivitätsoptimums für Leberhomogenat (s.Abb.7a; KHATRA u.Mitarb., 1977), während die Substratkonzentration bei Testung der Dekarboxylase aus methodischen Gründen nur ein geringes Mehrfaches (2-3-faches) des entsprechenden Km-Wertes betrug. (Zu geringe spez. Radioaktivität des Substrats bei weit höherer Substratkonzentration als im Test).

Dehydrogenase: $3,5 \times 10^{-4}$ mol/l, bei der Dekarboxylase: $1,5 \times 10^{-3}$ mol/l), die in getrennten Untersuchungen bestimmt wurden. Während die Aktivität der BCKA-Dehydrogenase des Patienten PUR deutlich gegenüber der Norm vermindert war, lag die der BCKA-Dekarboxylase im Bereich der Normalkontrollen.

Diskussion

Die spezifische Aktivität des BCKA-Dehydrogenasekomplexes (gemessen in einer Dekarboxylierungsreaktion mit den Substraten KICA und KIVA) im Leberhomogenat eines Patienten mit klassischer MSUD (PUR) war im Vergleich zu Normalkontrollen stark herabgesetzt. Demgegenüber lag die Aktivität der im Ferricyanid-Test funktionell von der weiteren Reaktionssequenz des Komplexes abgetrennten Dekarboxylase im Normalbereich (Tab. 10). Diese Daten weisen auf einen Defekt der Transacylase hin, dem zweiten Teilenzym im Zentrum des BCKA-Dehydrogenasekomplexes.

Die spezifische Aktivität der BCKA-Dehydrogenase der kindlichen Normalleber entsprach den Angaben von GOEDDE und KELLER (1968). Sie war aber etwas geringer als in dem von ROBINSON u.Mitarb. (1977) und TAYLOR u.Mitarb. (1978) untersuchten kindlichen Material, mit dem es am besten verglichen werden kann. Höhere Werte fanden KHATRA u.Mitarb. (1977) für Leber, die von akut verstorbenen Erwachsenen stammte und sofort nach der postmortalen Gewebsentnahme untersucht worden war; hingegen wies bioptisches Material von lebercirrhotischen Probanden reduzierte Werte, in dem hier gefundenen Bereich, auf (KHATRA u.Mitarb., 1977). KHATRA u.Mitarb. (1977) beschrieben auch einen 20%igen, durch Autolyse bedingten Aktivitätsverlust des mitochondrialen Enzyms, während 4-stündiger Lagerung bei 4°C .

Postmortal entnommenes Lebergewebe sowie Gewebe von nichtoperativ entfernten Feten beim Schwangerschaftsabbruch, ist wegen Autolyse niemals optimal in seinem Enzymgehalt. Bei den für die Untersuchung herangezogenen Normalkontrollen dürfte eine zusätzliche Leberschädigung bereits intra vitam eingetreten sein.

Material für enzymkinetische Studien der BCKA-Dehydrogenase kann in ausreichender Menge aber nicht durch Biopsie gewonnen werden, da die intramitochondriale Konzentration dieses spezifischen Dehydrogenasekomplexes sehr gering ist und z.B. nur 2% der Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenasekonzentration beträgt (ROBINSON u.Mitarb., 1977; TAYLOR u.Mitarb., 1978). Ein deutlicher Verlust an BCKA-Dehydrogenaseaktivität tritt auch durch Einfrieren und Auftauen von isolierten Mitochondrien auf (SULLIVAN u.Mitarb., 1976; DANNER u.Mitarb., 1979).

Unsicher ist, inwieweit die geringe Aktivität der BCKA-Dehydrogenase in der Leber des BCKA-stoffwechselgesunden Feten (Fet-JAC) ein postmortem Artefakt ist oder die aktuelle Enzymaktivität darstellt. Eine Entwicklung der BCKA-Dehydrogenaseaktivität während der Fetalperiode nach der 20. Schwangerschaftswoche, wie bei anderen Enzymen (z.B. Pyruvat-Dehydrogenase; BERGER u. HOMMES, 1975), ist denkbar und Angaben von DANCIS u.Mitarb.(1961) über fetale Meerschweinchenleber könnten einen Hinweis darauf geben. Bis zum Vorliegen verlässlicher fetaler Normalwerte kann eine Aussage über das defekte Teilenzym bei den beiden untersuchten Feten (MOR und BAU), die durch Testung der Amnionzellkulturen eindeutig als homozygot für klassische MSUD identifiziert worden waren, nicht gewagt werden. In der Leber beider Feten lag die Aktivität der BCKA-Dehydrogenase an der unteren Grenze des Meßbereichs.

Die apparenten K_m -Werte der BCKA-Dehydrogenase (2 bis 5×10^{-5} mol/l) entsprachen den Daten von Enzymen aus Rinderleber und menschlichen Leukozyten (GOEDDE u. KELLER, 1968), von partiell gereinigtem Enzym aus Rattenleber (PARKER u. RANDLE, 1978; DANNER u. Mitarb., 1978a) sowie von hochgereinigtem Enzym aus Rinderniere (PETTIT u. Mitarb., 1978). K_m -Werte für die BCKA-Dekarboxylase aus menschlichem Material, gemessen mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor des bei der Ketosäuredekarboxylierung entstehenden "aktiven Aldehyds", lagen nicht vor. RÜDIGER u. Mitarb. (1972) erhielten bei Messung der BCKA-Dekarboxylase mit DCP als Elektronenakzeptor und KIVA und MEVA als Substrate in menschlicher Normalleber sehr hohe K_m -Werte und biphasische Kinetiken ($1,6 \times 10^{-2}$ bzw. $1,2 \times 10^{-2}$ mol/l und $6,1 \times 10^{-3}$ bzw. $3,4 \times 10^{-3}$ mol/l). KICA wurde in diesem Testsystem kaum umgesetzt. Im Falle der MSUD waren die Kinetiken mit beiden Substraten monophasisch verändert.

Im Ferricyanid-Test ergab sich in jedem Fall eine monophasische Enzymkinetik für die BCKA-Dekarboxylase.

Höhere K_m -Werte der Dekarboxylase-Einheit im Ferricyanid-Test im Vergleich zu der mit Coenzym A und NAD stimulierten Dehydrogenase-Gesamtaktivität wurden auch für andere Ketosäure-Dehydrogenasen beschrieben (KANZAKI u. Mitarb., 1969; BLASS u. Mitarb., 1970). CONALLY u. Mitarb. (1968) gaben den K_m -Wert der BCKA-Dekarboxylase aus Rinderleber in einem Bereich von 10^{-3} mol/l an.

Die Substrataffinität der funktionell isolierten Dekarboxylase bei Einsatz von unphysiologischen und artifiziellen Elektronenakzeptoren ist immer geringer, als bei Messung der Ketosäure-Dekarboxylierung im Rahmen der physiologischen Gesamtreaktion, bei der die Liponsäure der Transacylase Akzeptorfunktion hat. Das findet seine

Erklärung darin, daß sämtliche Tests zur Messung der Dekarboxylase-Einheiten den natürlichen Reaktionsablauf zerstören.

In der vorliegenden Untersuchung überraschte die relativ hohe Kapazität (V_{max}) der Dekarboxylase (etwa 30%) im Vergleich zur Dehydrogenase, da der Ferricyanid-Test allgemein als relativ unempfindlich gilt (HUCHO, 1975; DANNER u. Mitarb., 1979). Das von ROBINSON u. Mitarbeiter (1977) und TAYLOR u. Mitarb. (1978) berichtete Aktivitätsverhältnis der BCKA-Dehydrogenase zur BCKA-Dekarboxylase von 5:1 bis 20:1 steht nicht im Widerspruch zu den eigenen Befunden, wenn man die unterschiedlichen apparenten K_m -Werte für beide Reaktionen und eine identische, relativ niedrige Substratkonzentration (z.B. $2,75 \times 10^{-4}$ mol/l, ROBINSON u. Mitarb., 1977) bei der Messung beider Enzyme berücksichtigt. Diese lag für die Dehydrogenase bereits im Sättigungsbereich, für die Dekarboxylase aber im linearen Anfangsbereich der Kinetik. Auch andere Autoren (STUMPF u. PARKS, 1978) benutzten zur Messung der beiden Enzymaktivitäten anderer Ketosäure-Dehydrogenasen identische niedrige Substratkonzentrationen und fanden ähnliche Unterschiede (10:1) der Aktivitäten. Die Frage, ob die Relation der Kapazität des Dekarboxylase-Teilenzym zu der des weiteren Reaktionsablaufs im Enzymkomplex bei der BCKA-Dehydrogenase höher als bei anderen α -Ketosäure-Dehydrogenasen ist, kann mit diesen Testansätzen nicht geklärt werden. Aus den Untersuchungen der Ketosäure-Dekarboxylierung in Fibroblasten könnte man auf ein entsprechendes Verhalten in diesen "extrahepatischen" Zellen schließen.

Während die Teilenzymanalyse bei genetischen Defekten im Pyruvat-Dehydrogenasekomplex durch Variation des pH, des Substrats und des Akzeptors in zerstörten Fibroblasten gelang (BLASS u. Mitarb., 1975) wurde dieser Weg bei der MSUD bisher nicht beschritten. Das liegt in der sehr geringen mitochondrialen Enzymaktivität für BCKA-Dehydrogenase begründet.

D: Untersuchungen zum Stoffwechsel von KICA und Leucin
in Fibroblasten-Kulturen

EINLEITUNG

Als Versuch zur biochemischen Differenzierung verschiedener MSUD-Zelllinien wurden mit der Mikromethode Kinetiken für die BCKA-Dekarboxylierung in intakten Fibroblasten von Normalpersonen und von Patienten mit klassischer MSUD und leichteren Varianten gemessen (WENDEL u.Mitarb., 1975).

Normale Zelllinien wiesen mit KICA, KIVA und MEVA biphasische Kinetiken der Dekarboxylierung auf (Abb. 9 und 10). Die bei Normalkontrollen vorhandene hyperbole Komponente mit hoher Substrataffinität aber geringer Kapazität (apparente K_m -Werte für alle drei Substrate unter 1×10^{-4} mol/l extrazellulär, V_{max} etwa 20 (KICA) bzw. 30 (KIVA) pmol $CO_2/\mu g$ Zellprotein x 4 h) war bei MSUD-Fibroblasten verändert: Entweder war sie nicht nachweisbar (KIVA und MEVA) oder sie schien sigmoid verändert (KICA) zu sein. Dagegen war eine Komponente mit geringer Substrataffinität und hoher Kapazität (halbmaximale Sättigung bei etwa 2 bis 4×10^{-3} mol/l, V_{max} 25 bis 75 (KICA) und 50 bis 175 (KIVA) pmol $CO_2/\mu g$ Zellprotein x 4 h) bei Normalkontrollen und MSUD-Zellen vorhanden. Nur eine MSUD-Zelllinie wies eine stark reduzierte Geschwindigkeit dieser zweiten Komponente auf.

Mit Ketosäuren ließ sich der metabolische Defekt in Fibroblasten von MSUD-Patienten nur bei sehr geringer Konzentration (5×10^{-5} mol/l) nachweisen. Bei hoher Konzentration (1 bis 16×10^{-3} mol/l) ließ eine Überschneidung der Werte für die Umsatzgeschwindigkeit die Differenzierung zwischen Kontrollen und Mutanten nicht zu.

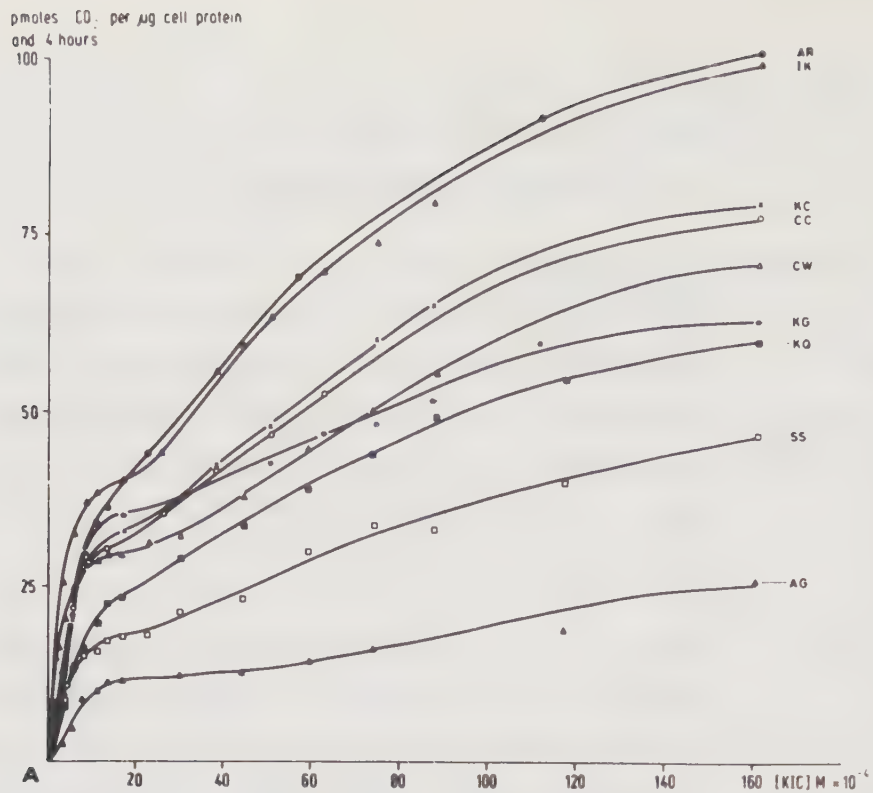


Abb. 9

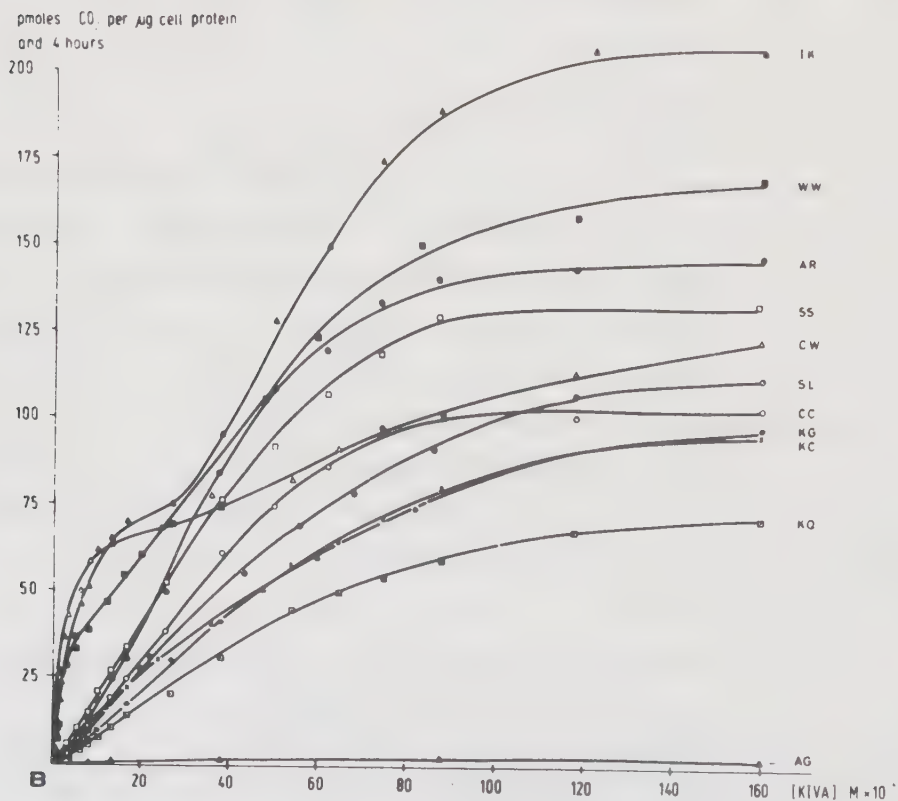


Abb. 10

Abb. 9 und 10

KICA-(Abb. 9) und KIVA-Dekarboxylierung (Abb.10) intakter Fibroblasten in Abhängigkeit von der extrazellulären Substratkonzentration. Zelllinien von Normalpersonen (IK, CW, WW), von Patienten mit MSUD-Varianten (KQ, HG, SS, AR) und klassischer MSUD (KG, AG, SL, CC, KC). (Aus WENDEL u. Mitarbeiter, 1975)

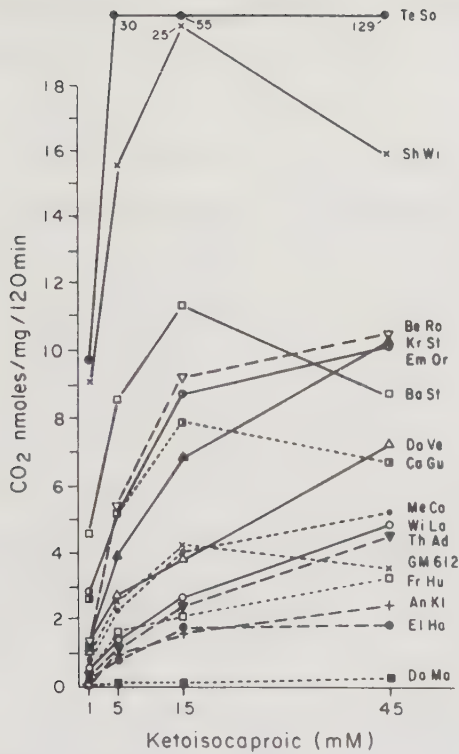


Abb. 11

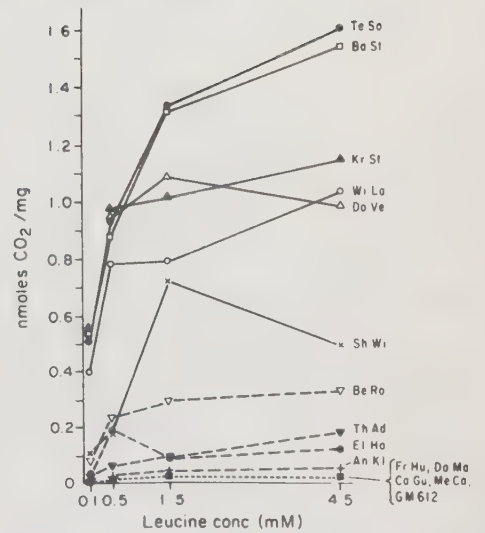


Abb. 12

Abb. 11 und 12

KICA-Dekarboxylierung durch intakte Fibroblasten in Abhängigkeit von der extrazellulären Leucin- (Abb. 11) und KICA-Konzentration (Abb. 12). Es wurde die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus $[1-^{14}\text{C}]$ -markierten Substraten während einer zweistündigen Inkubation gemessen. (—) Zelllinien von Normalpersonen, (---) Patienten mit MSUD-Varianten und (-----) klassischer MSUD. Die unterschiedlichen Skalen auf den Ordinaten sind zu beachten. (Aus: DANCIS u. Mitarb., 1977)

1977 untersuchten DANCIS u.Mitarb. Kinetiken der KICA-Dekarboxylierung intakter Fibroblasten mit den Ausgangssubstraten KICA und Leucin. Auch diesen Autoren gelang eine Unterscheidung zwischen normalen und MSUD-Fibroblasten nicht bei extrazellulären KICA-Konzentrationen von 1 bis 45×10^{-3} mol/l. Unterhalb von 1×10^{-3} mol/l KICA, dem Bereich der Komponente mit hoher Substrataffinität, konnten die Autoren aus methodischen Gründen nicht messen. Mit Leucin ließen sich hingegen bei jeder Konzentration (von 0,1 bis $4,5 \times 10^{-3}$ mol/l) normale von MSUD-Zellen unterscheiden; oberhalb von $0,5 \times 10^{-3}$ mol/l Leucin war nahezu Maximalgeschwindigkeit erreicht (Abb. 11 u. 12). Die Maximalgeschwindigkeit differierte bei beiden Substraten voneinander: mit Leucin als Ausgangssubstrat lag sie unterhalb, mit KICA weit oberhalb von 2 nmol CO_2 /mg Protein x 2 h (DANCIS u.Mitarb., 1977).

Da die Dekarboxylierung in den Zellen erst nach Transaminierung von Leucin zur KICA ablaufen kann, ergaben sich bei beiden Substraten durch vorgeschaltete Transport- und Transaminierungsprozesse wahrscheinlich ganz unterschiedliche intrazelluläre Ketosäurekonzentrationen. Mit Leucin als Substrat lagen sie vielleicht im Konzentrationsbereich der Komponente mit hoher, mit KICA im Bereich der Komponente mit geringer Substrataffinität.

Zur Klärung der Frage, in welchem Ausmaß Membrantransport und Transaminierung die intrazelluläre Konzentration der KICA mitbestimmen, wurde der intrazelluläre Gehalt an freiem Leucin und an KICA unter steady-state Bedingungen, jeweils nach 24-stündiger Exposition der Zellen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen. Außerdem wurde die Aufnahme von Leucin und KICA

in die Zellen untersucht. Durch Klärung der Zusammenhänge ließen sich Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren in Fibroblasten gewinnen und Aussagen über das defekte Teilenzym bei der MSUD machen.

METHODIK

Messung der intrazellulären Leucin- und KICA-Konzentrationen

Etwa 2,5 Millionen Fibroblasten (Normalkontrollen und MSUD-Zellen) wurden jeweils in Standardmedium in 75-cm²-Kulturflaschen 48 Std. lang bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers gezüchtet. Die Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren betrug im Medium: 0,36 mmol/l Valin, 0,34 mmol/l Isoleucin und 0,36 mmol/l Leucin. Die Monolayer wurden dann mit Medien (20 ml/Flasche) mit definierten Konzentrationen von KICA oder Leucin über 12 bis 24 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Medien abgesaugt und die gesamte Innenwandung der Kulturflaschen wurde während maximal 30 sec. fünfmal mit kalter PBS gespült. Vorversuche hatten gezeigt, daß fünfmaliges Spülen der Flaschen mit PBS zur Entfernung von extrazellulärer KICA und von Leucin erforderlich war, daß aber ein längeres Verweilen des Monolayers in PBS zu erheblichen Verlusten, insbesondere der intrazellulären Ketosäuren (innerhalb von 4 min um 20%) führte. Die Spülflüssigkeit wurde weitestgehend entfernt. Der am Boden haftende Zellrasen wurde nach Zusatz von 3 ml destilliertem Wasser durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Aus diesem Gemisch wurden 2 ml zur Bestimmung der BCAAs, 0,6 ml zur Messung der BCKAs und 50 µl zur Bestimmung des Zellproteins entnommen. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Der Versand der Proben zur α -Ketosäurenbestimmung nach Göttingen (Prof. Langenbeck) erfolgte auf Trockeneis.

Zur Analyse der freien verzweigtkettigen Aminosäuren wurden die Proben mit 50 mg/ml fester Sulfosalicylsäure enteivweißt. Der Überstand nach Zentrifugation wurde säulenchromatographisch auf einem Aminosäure-Analysator nach dem Kurzprogramm von BENSON u.Mitarb., (1967) analysiert. Besonderer Wert wurde auf Leucin gelegt. Eine Linearität zwischen Konzentration und Peakfläche lag zwischen 0,015 und 0,35 mmol/l Leucin vor. Die Wiederfindungsrate für Leucin betrug 94% bei 0,09 mmol/l und 103 % bei 0,02 mmol/l. Der Variationskoeffizient lag zwischen 5% (Konzentration: 0,09 mmol/l, N=12) und 10% (Konzentration: 0,02 mmol/l, N=6). Die Analyse der KICA erfolgte gaschromatographisch mit N-selektiver Detektion nach der Methode von LANGENBECK (LANGENBECK u.Mitarb., 1978). 0,5 ml der Proben wurden jeweils zur Präparation der O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate benötigt. Die Proteinbestimmung nach LOWRY erfolgte in 20 µl-Aliquots, die etwa 12 - 16 µg Protein enthielten. Die intrazellulären Mengen an Aminosäuren und KICA wurden auf Zellprotein bezogen. Es wurden die Mittelwerte von Doppelbestimmungen angegeben.

Messung der Leucin- und KICA-Aufnahme in die Zellen

Fibroblasten wurden auf Thermanox-Plastikfolien (LUX, 10,5 x 22 mm), jeweils 10 pro Petrischale, subkultiviert und 18 Std. in Standardmedium inkubiert. Die Leucin- und KICA-Aufnahme der Zellen wurde mit dem auf der Folie haftenden Monolayer untersucht. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Folien 30 min lang in Puffer bei 37°C inkubiert. Der Puffer (PBS + 20 mmol/l HEPES, 0,1% Glucose und 20% (v/v) dialysiertes fetales Kälberserum; End-pH 6,9) war identisch mit dem, der zur BCKA-Dekarboxylierung in Fibroblasten benutzt worden war (WENDEL u.Mitarb., 1975). Anschließend wurden die Folien 1 min lang in jeweils 1 ml Puffer mit unterschiedlicher Kon-

zentration von $[1-^{14}\text{C}]$ KICA (spezif. Radioaktivität: 54 mCi/mmol) oder $\text{L-}[U-^{14}\text{C}]$ Leucin (spezif. Radioaktivität: 332 mCi/mmol) bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Folien in PBS bei Raumtemperatur (6 sec maximal) intensiv gespült und in Scintillationsgefäße zur Messung der intrazellulär akkumulierten Radioaktivität überführt. Als Blindwertedienten kurzfristig mit Inkubationsgemisch benetzte und gespülte Folien. Sie entsprachen 0,5 bis 1 pmol Substrat. Für jede Substratkonzentration wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Der Proteingehalt des Monolayers auf den Folien, gemessen mit der LOWRY-Methode, betrug 90 bis 110 μg .

Bei zeitabhängiger Substrataufnahme in die Zellen war ein Äquilibrium nach 10 min für KICA und nach 20 min für Leucin erreicht. Die Inkubation der Monolayer von einer Minute entsprach der linearen Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme.

Ergebnisse:

In Tabelle 11 ist der intrazelluläre Gehalt der verzweigtkettigen Aminosäuren in Fibroblasten unter steady-state-Bedingungen bei Kultur im Standardmedium gezeigt. Der Gehalt an verzweigtkettigen Ketosäuren lag im unteren, nicht exakt meßbaren Bereich. Tabelle 12 zeigt den Leucin- und KICA-Gehalt der Zellen nach 24-stündiger Inkubation im Medium mit 2,35 mmol/l Leucin. Tabelle 13 zeigt den intrazellulären KICA- und Leucin-Gehalt bezogen auf Zellprotein unter steady-state-Bedingungen, von einer Normalkontrolle und einer MSUD-Zelllinie bei Variation der extrazellulären Leucin- oder KICA-Konzentration.

Tabelle 11

Intrazellulärer BCAA-Gehalt bei Kultur der Fibroblasten in Standardmedium

Zelllinie	Valin	Isoleucin ($\mu\text{mol/g}$ Zellprotein)	Leucin
<u>Normalkontrollen</u>			
ST	16,3	14,5	25,4
SG	19,4	10,4	27,7
RI	16,9	13,8	19,7
CE	28,6	26,8	41,2
<u>MSUD</u>			
TAV(klassisch)*	{ 20,8 32,8	18,6 24,6	29,0 38,5
SOR(klassisch)	20,3	10,9	25,4
GÜN(Variante)*	{ 21,3 24,8	12,3 13,9	27,2 30,5

*) Die Werte wurden in zwei unabhängigen Experimenten gemessen. Die BCAA-Konzentrationen im Kulturmedium betrugen: 0,36 mmol/l Valin, 0,34 mmol/l Isoleucin und 0,36 mmol/l Leucin. Die intrazelluläre KICA-Konzentration konnte nur ungenau bestimmt werden. Sie betrug um 0,3 $\mu\text{mol/g}$ Protein.

Tabelle 12

Intrazellulärer Leucin- und KICA-Gehalt bei Kultur der Fibroblasten in leucinangereichertem Standardmedium

Zelllinie	Leucin ($\mu\text{mol/g}$ Zellprotein)	KICA
<u>Normalkontrollen</u>		
HA	120,0	3,2 ²
RI	74,0; 64,4	1,95 ¹
KE	105,0	3,0 ²
<u>MSUD</u>		
TAV(klassisch)	86,9 + 8,9*	3,7 ¹
	108,6; 79,8	2,25
PUR(klassisch)	138,9; 90,4	10,2 ²

Die Werte wurden z.T. in verschiedenen Experimenten gemessen.

*) Parallele Messungen (N=6): $\bar{X} \pm \text{S.D.}$

1) und 2): Die Werte wurden gleichzeitig unter identischen Bedingungen gemessen.

Die BCAA-Konzentrationen im Kulturmedium betrugen: Valin und Isoleucin wie unter Tab. 11, Leucin 2,35 mmol/l, KICA: etwa 5 $\mu\text{mol/l}$.

Tabelle 13

Intrazellulärer Leucin- und KICA-Gehalt bei Exposition der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Substanzen im Kulturmedium

Medien	Protein (mg)	Leucin ($\mu\text{mol/g}$ Protein)	KICA ($\mu\text{mol/g}$ Protein)	Verhältnis: Leucin/KICA
<u>PUR (MSUD)</u>				
8,3 mmol/l Leucin	1,45	212,9	10,2	20,8
2,3 mmol/l Leucin	1,43	138,9	10,2	13,6
15,6 mmol/l KICA	1,20	102,5	64,6	1,5
7,6 mmol/l KICA	1,55	78,6	13,9	5,7
3,6 mmol/l KICA	1,59	64,2	7,7	8,3
1,5 mmol/l KICA	1,38	68,5	7,3	9,4
<u>HAG (Normalkontrolle)</u>				
8,3 mmol/l Leucin	2,72	196,7	4,6	42,8
2,3 mmol/l Leucin	2,78	120,5	3,2	37,6
15,6 mmol/l KICA	2,35	79,2	66,7	1,2
7,6 mmol/l KICA	2,50	82,6	25,1	3,3
3,6 mmol/l KICA	2,70	68,9	6,8	10,1
1,5 mmol/l KICA	2,60	56,3	5,1	11,1

Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen. Angegeben wurden nur die Leucin- und KICA-Konzentrationen der Medien; andere BCAA-Konzentrationen wie im Standardmedium. Werte unter steady-state-Bedingungen nach 24-stündiger Kultur der Zellen in den verschiedenen Medien.

Mit steigender extrazellulärer Leucinkonzentration (bis 8,3 mmol/l) akkumulierten beide Zelllinien gleichartig Leucin (Abb. 13), wobei der Leucingehalt der MSUD-Zelllinie etwas höher lag. Der KICA-Gehalt von Normalzellen stieg unter der Leucinbelastung gering an, im Verhältnis 1:40 zum intrazellulären Leucin; für die MSUD-Zelllinie lag der KICA-Gehalt höher, das Verhältnis zum Leucin betrug hier 1:15 bis 1:20.

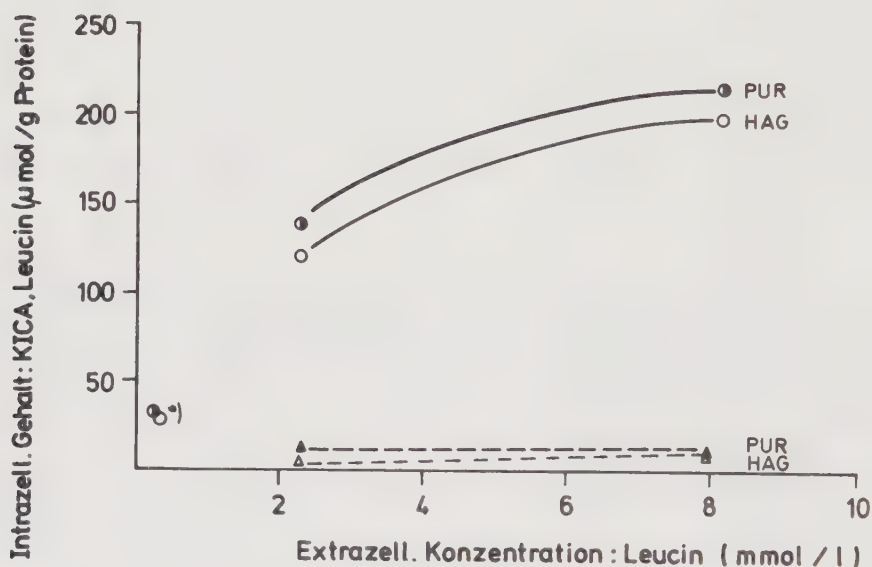


Abb. 13

Zellulärer Leucin-(—) und KICA-(---) Gehalt von Fibroblasten unter steady-state-Bedingungen nach 24-stündiger Kultur in Medien mit verschiedenen Leucinkonzentrationen.

*) Mittelwert von 4 Zelllinien (Normalkontrollen) und 3 MSUD-Linien bei Kultur in Standardmedium (0,35 mmol/l Leucin) (aus Tab. 11). Der entsprechende KICA-Wert ist zu ungenau.

PUR: klassische MSUD, HAG: Normalkontrolle.

Die steigende extrazelluläre KICA-Konzentration (1,5 bis 15,6 mmol/l) bewirkte einen Anstieg des intrazellulären KICA-Gehaltes, in gleicher Weise für beide Zelllinien (Abb. 14).

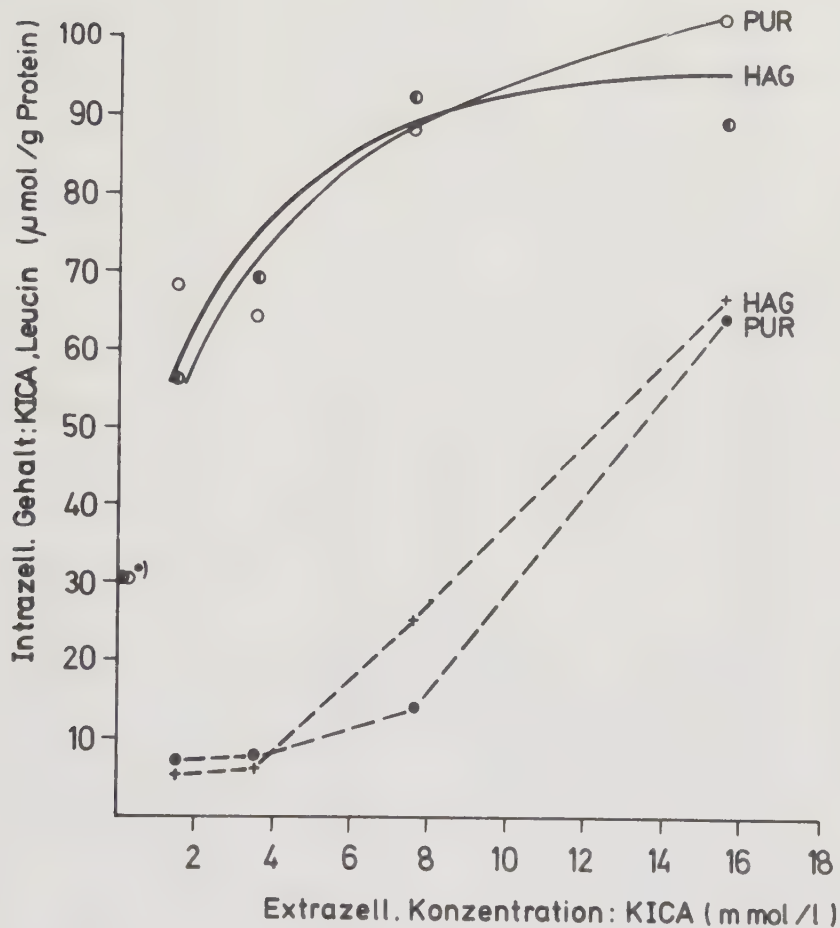


Abb. 14

Zellulärer Leucin-(—) und KICA-(---)Gehalt von Fibroblasten unter steady-state-Bedingungen nach 24-stündiger Inkubation in Medien mit unterschiedlichen KICA-Konzentrationen.

*) Siehe Legende zu Abb. 13.

PUR: klassische MSUD, HAG: Normalkontrolle.

Oberhalb von 6 mmol/l akkumulierten die Zellen das Substrat linear, während bei Konzentrationen zwischen 2 und 6 mmol/l nur geringe Änderungen erfolgt waren. Möglicher-

Tabelle 14

Änderung der KICA-Konzentration in den Kulturmedien nach 24-stündiger Inkubation der Zellmonolayer

KICA-Zuwachs im Medium bezogen auf Zellprotein des Monolayers			
Medien	PUR (MSUD)		HAG (Normalkontrolle)
8,3 mmol/l Leucin	1,86 μ mol/mg Protein x 24h		0,86 μ mol/mg Protein x 24h
2,3 mmol/l Leucin	1,51 μ mol/mg Protein x 24h		0,94 μ mol/mg Protein x 24h
KICA-Ausgangskonzentration im Medium: 5,6 μ mol/l			

KICA-Abnahme im Medium bezogen auf Zellprotein des Monolayers			
Medien	PUR (MSUD)		HAG (Normalkontrolle)
15,6 mmol/l KICA	16,3 μ mol/mg Protein x 24h		28,2 μ mol/mg Protein x 24h
7,6 mmol/l KICA	10,3 μ mol/mg Protein x 24h		8,2 μ mol/mg Protein x 24h
3,6 mmol/l KICA	9,5 μ mol/mg Protein x 24h		3,5 μ mol/mg Protein x 24h
1,6 mmol/l KICA	2,8 μ mol/mg Protein x 24h		3,2 μ mol/mg Protein x 24h

Maximale KICA-Dekarboxylierung bei 16 mmol/l KICA: 50-100 nmol/mg Zellprotein x 3h

weise enthielten die MSUD-Zellen im unteren Konzentrationsbereich mehr KICA als die Normalkontrollen. Der zelluläre Leucingehalt stieg unter der KICA-Belastung, ausgehend von 30 $\mu\text{mol/g}$ Zellprotein (Standardmedium), in nichtlinearer Weise deutlich an. Das Verhältnis von Leucin zu KICA betrug bei niedrigen extrazellulären KICA-Konzentrationen (bis 3,6 mmol/l) etwa 10:1 und verringerte sich bei hoher KICA-Konzentration auf nahezu 1,5:1.

Eine eindeutige Hemmung des Zellwachstums, sichtbar am verminderten Zellprotein (Tab. 13) bestand nur bei 16 mmol/l KICA und zwar für beide Zelllinien. Leucin hemmte das Wachstum nicht signifikant. Das Wachstum der MSUD-Zelllinie scheint jedoch im Vergleich zur Normalkontrolle in allen Medien geringer gewesen zu sein, wobei die Zellzahlen beider Linien vor Beginn des Experiments gleich waren.

Die Tab. 14 zeigt die Änderung der KICA-Konzentration im Kulturmedium: Eine Anreicherung während der Leucin-Belastung der Zellen und eine deutliche Konzentrationsabnahme bei Belastung der Zellen mit KICA. Während der Inkubation mit Leucin (2,3 u. 8,3 mmol/l) bildeten die Zellen KICA, die zum großen Teil ins Kulturmedium gelangte: bei MSUD-Zellen etwa doppelt so viel wie bei Normalkontrollen. Bei Belastung der Zellen mit KICA war die Konzentrationsabnahme im Medium stärker als ihrer enzymatischen Dekarboxylierung und Akkumulation in den Zellen entsprach.

Die Aufnahme von KICA und Leucin in die Fibroblasten, in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration, erfolgte im niedrigen Konzentrationsbereich (unter 0,2 mmol/l) nichtlinear (hyperbol), bei hohen Konzentrationen aber linear zur extrazellulären Konzentration (Abb. 15). Sie verlief nach den Kriterien eines saturablen Transportprozesses und einer zusätzlichen Diffusion

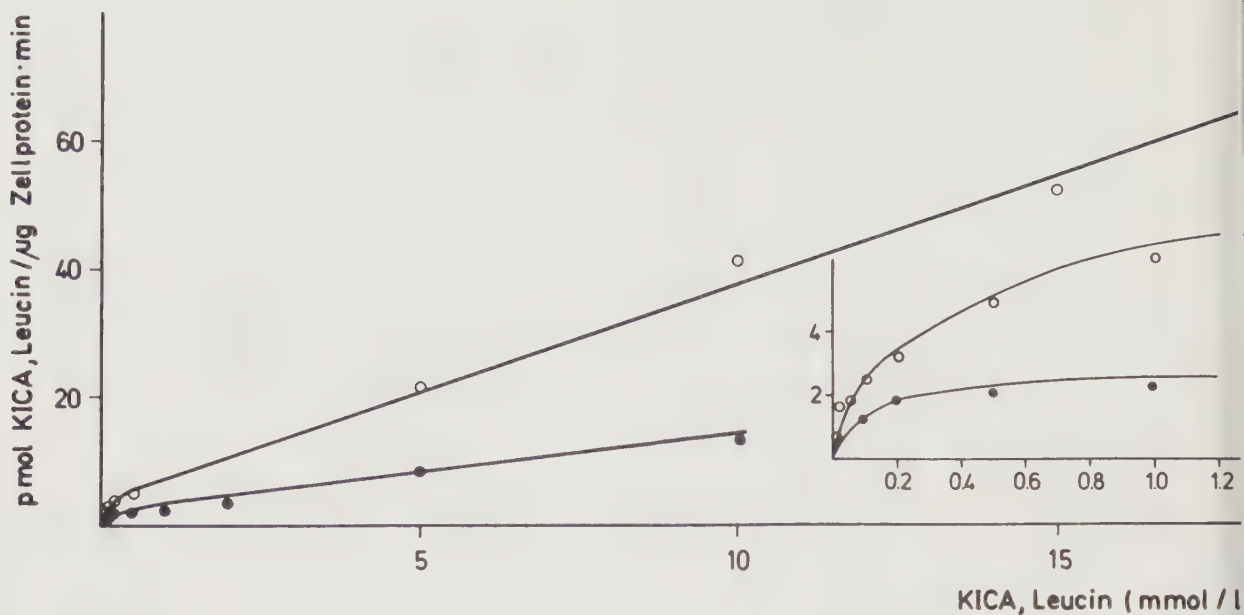


Abb. 15

Konzentrationsabhängige Aufnahme von Leucin (●—●) und KICA (○—○) in Fibroblasten, die im Monolayer auf Plastikfolien wuchsen. Jeder Punkt entspricht einer Dreifachbestimmung abzüglich des Blindwertes. Es wurde die aus $[U-^{14}C]$ Leucin und aus $[1-^{14}C]$ KICA stammende intrazelluläre Radioaktivität gemessen, die während einer Minute aus Medien mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen aufgenommen worden war.

Einschub: Nichtlinearer Kurvenverlauf bei vergrößertem Maßstab.

(NEAME u. RICHARDS, 1972), die bei KICA erheblich stärker war als bei Leucin.

Diskussion

1. Intermediärstoffwechsel von Leucin und KICA in Fibroblasten

Der intrazelluläre Gehalt von freiem Leucin und von KICA unter steady-state-Bedingungen in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration beider Substrate gab Aufschluß über den Intermediärstoffwechsel

der verzweigtkettigen Substanzen in Fibroblasten in der Kultur. Fibroblasten von Normalpersonen und von MSUD-Patienten glichen einander im Leucingehalt bezogen auf Zellprotein bei Kultur in Medien mit unterschiedlichen Leucinkonzentrationen. Die Werte entsprachen denen von MELANCON u.Mitarb. (1972) und SHIH u.Mitarb. (1975) für normale und MSUD-Fibroblasten. Demgegenüber wiesen MSUD-Lymphoblasten unter verschiedenen Kulturbedingungen höhere Leucin- und Isoleucinkonzentrationen als Normalzellen auf (SKAPER u.Mitarb., 1976).

In der vorliegenden Untersuchung wurde der intrazelluläre Gehalt der verzweigtkettigen Substanzen bezogen auf Zellprotein angegeben. Um intrazelluläre Konzentrationen nennen zu können, hätte man in jedem Einzelexperiment das mittlere Zellvolumen oder den intrazellulären Flüssigkeitsraum bestimmen müssen, da beide Parameter von der Proliferationsphase der Zellen und vom Stadium ihrer Konfluenz abhängen. Es wurde aber mehrfach gezeigt, daß das Zellprotein dem intrazellulären Flüssigkeitsraum proportional ist (FOSTER u. PARDEE, 1969; GROTH u. ROSENBERG, 1972; BOOTH u. NADLER, 1975).

Die Leucinaufnahme in Fibroblasten in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration war charakteristisch für einen saturablen Transportprozeß (apparenter Km-Wert etwa $1,5 \times 10^{-4}$ mol/l, überlagert von einer geringfügigen Diffusion. Bereits früher wurde ein Natrium-unabhängiges Transportsystem für Leucin (Km-Wert $3,3 \times 10^{-4}$ mol/l, $V_{\max} = 150 \mu\text{mol/mg Zellprotein} \times 10 \text{ min}$) bei menschlichen Fibroblasten in Kultur beschrieben (BOOTH u. NADLER, 1975).

Die reversible Aminosäure-Transaminierung -mitochondrial und cytoplasmatisch (AKI u.Mitarb., 1967;

TAYLOR u.Mitarb., 1966)- wird durch mehrere Enzyme katalysiert, die abgestufte Spezifität für die drei BCAAs (ICHIHARA u.Mitarb., 1972) oder eine strenge Spezifität für nur eine BCAA (z.B. Leucin, IKEDA, 1976) besitzen und unterschiedliche Gewebsverteilung haben. Während Skelettmuskel die höchste Totalaktivität hat, ist die höchste spezifische Aktivität in der Niere lokalisiert (ADIBI, 1976). Aminoakzeptoren sind α -Ketoglutarat und die BCKAs wechselseitig (DAWSON u. HIRD, 1968).

Bei Exposition der Zellen mit Leucin entstand aus akkumuliertem Leucin durch Transaminierung KICA, bei Normalkontrollen in einem Verhältnis zum intrazellulären Leucin von 1:40. Entsprechend dem relativ geringen Zuwachs an Leucin in den Zellen bei extrazellulären Konzentrationen oberhalb von 2 mmol/l, änderte sich der geringe intrazelluläre KICA-Gehalt kaum. Ein Teil der KICA verließ die Zellen. Ihre Menge war bei MSUD-Fibroblasten größer als bei normalen Zellen, sie betrug aber auch bei Normalkontrollen ein Mehrfaches der in der Zeit durch Dekarboxylierung umgesetzten Menge. Wie im Medium war auch der KICA-Gehalt in den MSUD-Fibroblasten höher als in normalen Zellen, wahrscheinlich bedingt durch den Stau des Substrats vor dem metabolischen Block und durch Kompartimentierung in den Mitochondrien. So ließ sich bei einem geringen intrazellulären KICA-Gehalt anhand der Metabolitenkonzentration ein durch Enzymdefekt bedingter verminderter Substratumsatz tatsächlich nachweisen.

Die Belastung der Zellen mit KICA in der gewählten Konzentration war überwiegend unphysiologisch, eröffnete aber einen guten Einblick in den KICA-Metabolismus intakter Fibroblasten unter Bedingungen der

Stoffwechselentgleisung bei der MSUD (mit stark erhöhten Konzentrationen von KICA).

Bei der Aufnahme der KICA in die Zellen scheint ein durch Substratsättigung limitierter Transportprozeß nur bei sehr geringen Konzentrationen Bedeutung zu haben, bei hohen Konzentrationen erfolgte die Aufnahme überwiegend durch starke passive Diffusion. Bei der hier demonstrierten saturablen Transportkomponente könnte es sich um das Natrium-abhängige, durch andere BCKAs kompetitiv hemmbare Transportsystem handeln, das bei menschlichen Fibroblasten nachgewiesen wurde (TARPEY u.Mitarb., 1977). Der starke Diffusionsanteil der BCKAs im Vergleich zu den BCAAs bei der Aufnahme in die Zellen scheint auch für andere Gewebe Gültigkeit zu haben (McGIVAN u.Mitarb., 1977; WEBER u.Mitarb., 1979) und die Diffusion der Ketosäuren mag auch bei der schnellen Gewebsaufnahme der BCKAs (PROZEFSKY u. WALSER, 1977; HUTSON u.Mitarb., 1978) eine wesentliche Rolle spielen.

Bei extrazellulären Konzentrationen von mehr als 6 mmol/l KICA entsprach die lineare Akkumulation in den Zellen wahrscheinlich der starken Diffusion der Substanz in die Zellen. Die geringe Änderung des intrazellulären KICA-Gehaltes und die starke Zunahme des Leucins bei extrazellulären Konzentrationen zwischen 2 und 6 mmol/l KICA dürften durch sehr aktive Transaminierung der in die Zellen eingetretenen Ketosäure verursacht sein. Bei diesem intrazellulären KICA-Konzentrationsbereich mag für die cytoplasmatische Transaminierung ein Konzentrationsoptimum vorliegen (Km-Werte für die cytoplasmatische BCAA-Amniotransferasen im Bereich von 10^{-3} mol/l, AKI u.Mitarb., 1967; ADIBI u.Mitarb., 1976). Sichtbar an der Verschiebung des Transaminierungsgleichgewichts Leucin zu KICA von 10:1 nach 1,5:1 blieb die Transaminierungsrate bei hohen extrazellulären KICA-Konzentrationen hinter der

Akkumulationsrate zurück, wahrscheinlich wegen erschöpfter Kapazität der Enzyme (Substratsättigung der Enzyme oder Erschöpfung der Aminogruppen-Donatoren), dagegen lief die Akkumulation konzentrationsabhängig linear weiter.

Der KICA-Gehalt der MSUD-Fibroblasten und Normalkontrollen war identisch, und die Zellarten waren nicht sicher zu unterscheiden. Dieser Parameter wurde überwiegend durch zelluläre Aufnahme und Transaminierung bestimmt, während der Anteil der Dekarboxylierung am KICA-Stoffwechsel verhältnismäßig gering war und sich nach früheren Untersuchungen (Abb. 9, WENDEL u.Mitarb., 1975; Abb. 11, DANCIS u.Mitarb., 1977) für MSUD-Zellen und Normalkontrollen bei hohen KICA-Konzentrationen nicht signifikant unterschied. Auch die im Hinblick auf die zelluläre KICA-Dekarboxylierung überproportionale Abnahme der KICA-Konzentration im Medium (von der allerdings ein Teil durch spontane Dekarboxylierung verschwunden sein könnte) wies auf eine hohe Transaminierungskapazität der Zellen hin mit Abgabe gebildeten Leucins in das Medium.

Diese Daten zeigen, daß, wie auch in anderen extrahepatischen Geweben verschiedener Tierspezies und beim Menschen, besonders im Skelettmuskel (WALSER u.Mitarb., 1973; SHINNIK u. HARPER, 1976; KHATRA u.Mitarb., 1977; PROZEFSKY u. WALSER, 1977; MITCH u. CHAN, 1978; HUTSON u.Mitarb., 1978), in Fibroblasten die Transaminierung eine hohe Kapazität besitzt und daß der geschwindigkeitslimitierende Schritt im BCAA/BCKA-Metabolismus der Zellen die BCKA-Dekarboxylierung ist.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die während einer Minute durch die Zellen akkumulierte Radioaktivität der KICA- und Leucin-Aufnahme in die Zellen gleichgesetzt. Der Stoffwechsel während dieser kurzen Zeitspanne, in erster Linie Transaminierung sowie der

Auswärtstransport des jeweiligen Transaminierungsprodukts, wurde nicht berücksichtigt. Beide Vorgänge hatten während einer 4-minütigen Inkubation von Lymphoblasten mit KICA bereits einen beachtlichen Umfang erreicht (TARPEY u.Mitarb., 1977).

Die KICA-Konzentration in Zellen und Geweben ist normalerweise sehr gering. Sie blieb auch in Perfusionsexperimenten mit Muskelgewebe bei unphysiologisch hoher Leucinkonzentration aufgrund der hohen Transaminierungskapazität (mit Schwerpunkt auf Seiten der Aminosäure) gering ($< 0,013$ mmol/l im Rattenmuskel). Diese gaschromatographisch gewonnenen Daten (HUTSON u.Mitarb., 1978; CREE u.Mitarb., 1979) dürften allerdings methodisch bedingt, extrem tief liegen. Realistische Werte berichteten LANGENBECK u.MATTHAEI (pers. Mitteilung) für Muskelgewebe unter normalen Bedingungen. In Rattenmuskel betrugen die Konzentrationen (bezogen auf freies intrazelluläres Wasser) für KIVA $33,3 \pm 12,9$, für MEVA $13,2 \pm 5,4$ und für KICA $14,6 \pm 6,0$ $\mu\text{mol/l}$ (6 Ratten, N=11), in menschlichem Muskelgewebe für KIVA $17,3 \pm 6,7$ für MEVA $8,4 \pm 5,3$ und für KICA $7,6 \pm 6,9$ $\mu\text{mol/l}$ (11 Normalpersonen).

KICA im millimolaren Konzentrationsbereich wirkt cytotoxisch auf Zellen des Zentralnervensystems in Kultur und hemmt die Zellproliferation (SILBERBERG, 1969; LIAO u.Mitarb., 1978). Leucin und KICA, ebenfalls im millimolaren Bereich, hemmt das Wachstum von MSUD-Lymphozyten, aber nicht das normaler Zellen (SKAPER u. Mitarb., 1976). In der vorliegenden Untersuchung war das Wachstum aller Zelllinien bei 16 mmol/l KICA gehemmt, sichtbar an der verminderten Ausbeute an Zellprotein. 8 mmol/l Leucin erzeugte keine entsprechende Hemmung. Die konstant geringere Ausbeute an Zellprotein für MSUD-Fibroblasten (Tab. 13), bei jeweils gleicher Zellzahl zu Testbeginn, könnte man als eine Hemmung der Zellpro-

liferation bereits durch geringere KICA- und Leucin-konzentrationen werten.

2. Interpretation der Kinetiken der KICA- und Leucin-Dekarboxylierung in Fibroblasten

Die Aufnahme der KICA in Fibroblasten und die intrazelluläre Transaminierung verlaufen nach unterschiedlichem Muster. Beide Vorgänge beeinflussen die intrazelluläre KICA-Konzentration maßgeblich, während die Dekarboxylierung dabei nur eine untergeordnete Rolle spielt. Eine ähnliche Konstellation der intrazellulären Metaboliten wie unter den oben beschriebenen steady-state-Bedingungen dürfte auch während der vier- bzw. zweistündigen Inkubation der Zellen zur Erstellung der Kinetiken der BCKA-Dekarboxylierung (Abb. 9, WENDEL u.Mitarb., 1975; Abb. 11, DANCIS u.Mitarb., 1977) herrschen. Unter Berücksichtigung dieser Befunde können früher publizierte Daten (WENDEL u.Mitarb., 1975) weiterführend interpretiert werden, wenn auch wichtige Punkte wie Substrattransport in die Mitochondrien, Kompartimentierung und intramitochondriale Metabolitenkonzentration unbekannt bleiben.

Danach weisen MSUD-Fibroblasten auch mit KICA, wie bereits für KIVA und MEVA nachgewiesen (Abb. 10) jeweils nur eine Komponente für die Dekarboxylierung auf und zwar eine mit geringer Substrataffinität. Trägt man nämlich wie in Abb. 16 die Geschwindigkeit der KICA-Dekarboxylierung gegen den linearen Zuwachs an intrazellulärer KICA auf und nicht wie in Abb. 9, gegen die lineare extrazelluläre KICA-Konzentration, so verschwindet die plateauartige Verformung der Kinetik zwischen 2 und 6 mmol/l KICA extrazellulär (Abb. 9): Die früher beschriebenen Unterschiede in den Kinetiken der einzelnen Ketosäuren für MSUD-Zellen betreffen nicht die De-

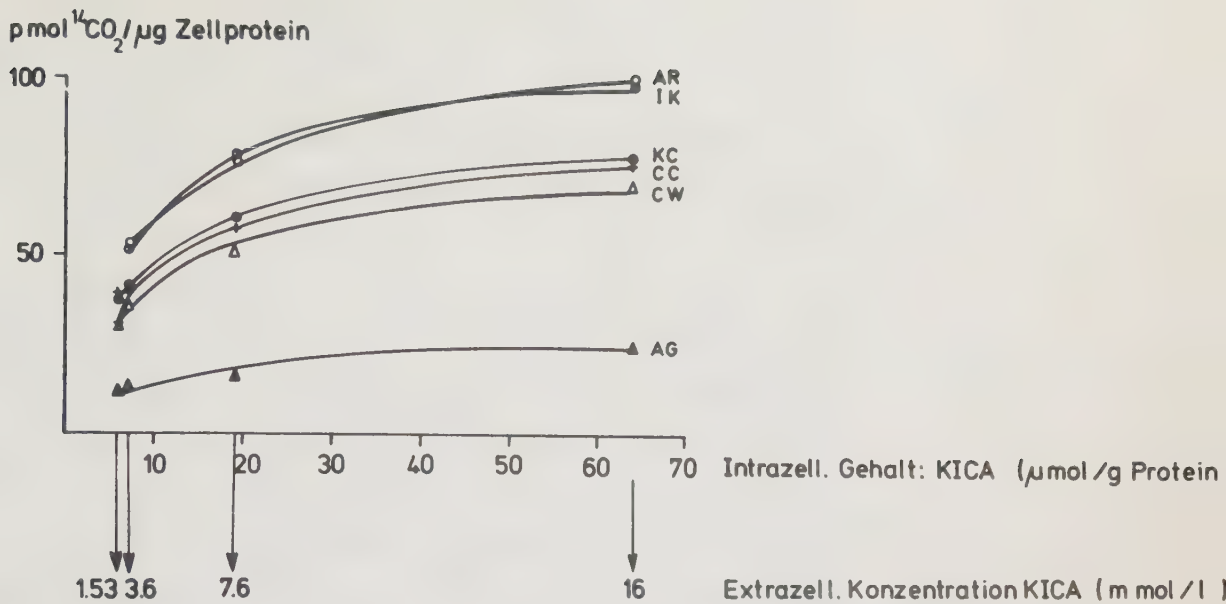


Abb. 16

Abhängigkeit der KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten vom linearen Zuwachs an intrazellulärer KICA. Es wurden die Daten aus Abb. 9 verwendet. Bei Zuordnung des intrazellulären KICA-Gehalts zur extrazellulären KICA-Konzentration (untere Skala der Abszisse) wird deutlich, daß die biphasische Kinetik der KICA-Dekarboxylierung in MSUD-Fibroblasten (Abb. 9) durch Transportprozesse und Transaminierung entsteht. Wie mit KIVA und MEVA weisen MSUD-Zellen nur eine Enzymkomponente (mit geringer Substrataffinität) auf.

karboxylierung, sondern das Zusammenspiel von Substrataufnahme in die Zelle und Transaminierung, das demnach für KIVA und MEVA anders als für KICA ist.

Fibroblasten von Normalpersonen enthalten ebenfalls die Komponente der Dekarboxylierung mit geringer Substrataffinität. Diese ist bei der MSUD nicht durch Mutation beeinflusst. Hingegen muß die BCKA-Dekarboxylierung mit hoher Substrataffinität der Reaktion des bei MSUD defekten BCKA-Dehydrogenasekomplexes entsprechen. In Fibroblasten von Normalpersonen zeigt diese Komponente auch die für die BCKA-Dehydrogenase bekannte ab-

gestufte Umsatzgeschwindigkeit für die drei Keto-säuren: KIVA>MEVA>KICA (GOEDDE u. KELLER, 1968; DANNER u. ELSAS, 1974; PETTIT u. Mitarb., 1978; DANNER u. Mitarb., 1979). Die Restfunktion dieser Komponente ließ sich bei MSUD-Fibroblasten mit radioaktiv markierten α -Ketosäuren nicht sicher feststellen.

Die intrazelluläre (intramitochondriale) KICA-Konzentration war für den Bereich der BCKA-Dekarboxylierung mit hoher Substrataffinität direkt nicht meßbar, sie dürfte sehr gering sein. Bei graphischer Analyse der Kinetiken (Abb. 17 u. 18) resultiert ein Aktivitätsoptimum für diese Enzymfunktion in Zellen, die einer Substratsättigung entsprechen könnte, oberhalb von $2,0 \times 10^{-4}$ mol/l extrazellulärer KICA-Konzentration (apparenter K_m -Wert kleiner als 5×10^{-5} mol/l extrazellulär).

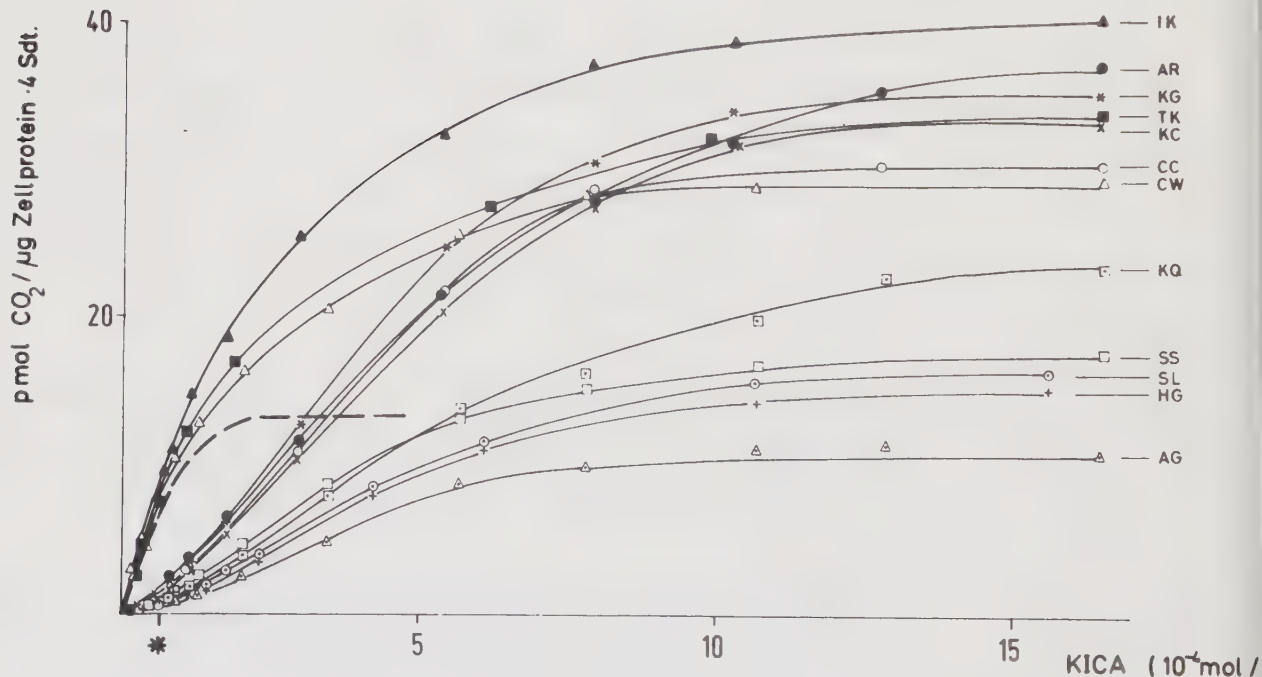


Abb. 17

KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten in Abhängigkeit von der extrazellulären KICA-Konzentration. Gestrichelte Linie: Die Werte wurden durch Subtraktion der jeweiligen Mittelwerte von 3 normalen Zelllinien (TK, IK, CW) und von 9 MSUD-Linien gewonnen und dürften der KICA-Dekarboxylierung im Rahmen des Gesamtzyklomplexes entsprechen, die sich nur in normalen Zellen findet. *)apparente Michaelis-Konstante dieser Funktion (Daten aus Abb. 2 der Arbeit von WENDEL u. Mitarb., 1975).

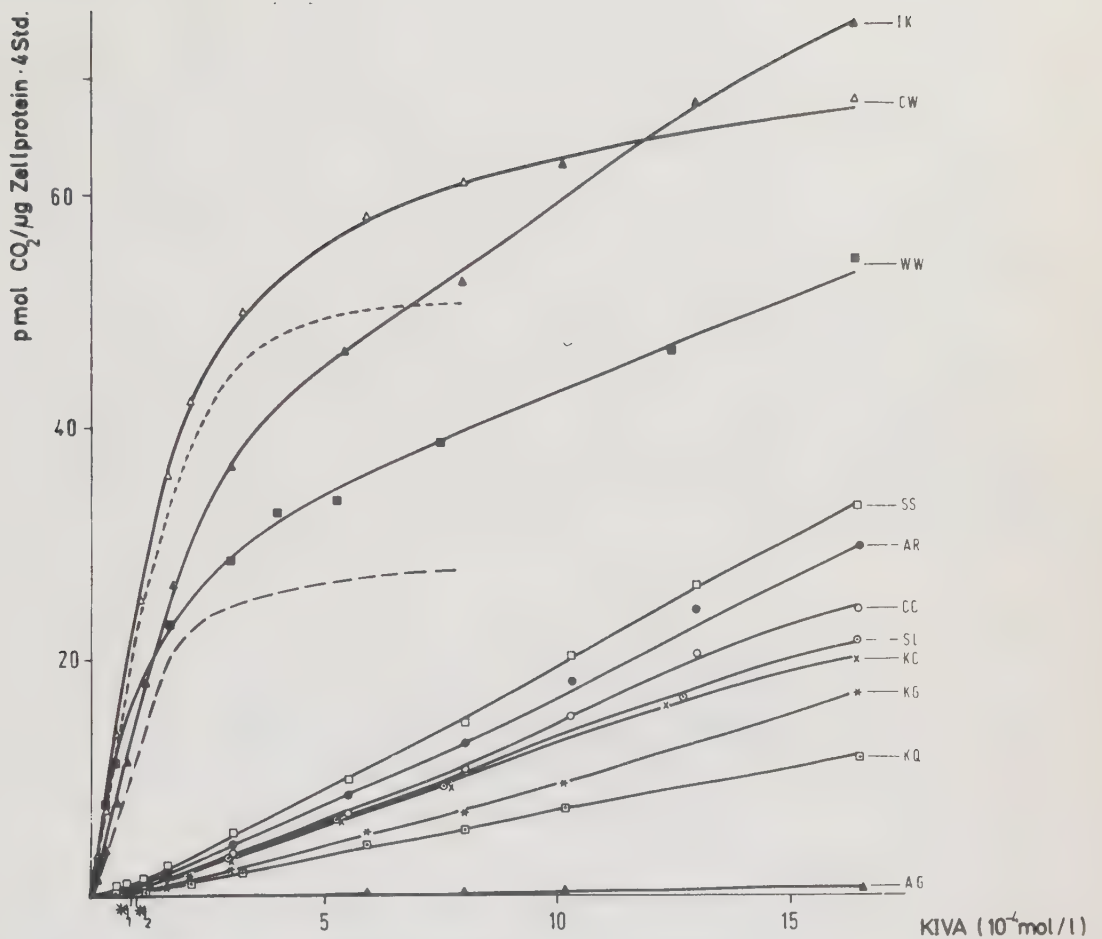


Abb. 18

Der Abb. 17 entsprechende Darstellung der KIVA-Dekarboxylierung. In diesem Fall wurden die Werte der normalen Zelllinien CW und WW getrennt erstellt. *1) und *2): Apparente K_m -Werte dieser Funktion, die nur normale Zelllinien aufweisen (Daten aus WENDEL u.Mitarb., 1975).

Der "intrazelluläre" K_m -Wert für Substrat am Ort des Enzyms in situ bleibt unbekannt und könnte geringer sein als für Leberhomogenat. Sehr geringe KICA-Konzentrationen dürften bei der Verwendung von $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin (selbst bei hohen extrazellulären Leucinkonzentrationen) intrazellulär durch Transaminierung entstehen, die immer unterhalb der Sättigungskonzentration für die Dehydrogenase bleiben. Da beim Leucinabbau in Fibroblasten die

Transaminierung nicht geschwindigkeitslimitierend ist, kann $[1-^{14}\text{C}]$ -Leucin als Substrat zur Untersuchung des BCKA-Katabolismus in den Zellen eingesetzt werden. Durch die KICA-Dekarboxylierung beim Einsatz von Leucin scheint die Restaktivität des durch Mutation veränderten BCKA-Dehydrogenasekomplexes relativ genau bestimmbar zu sein (DANCIS u.Mitarb., 1977). Selbst bei extrem hoher extrazellulärer Leucinkonzentration lassen sich nur gleiche Dekarboxylierungsgeschwindigkeiten erzielen wie bei extrazellulären KICA-Konzentrationen von weit unterhalb 0,2 mmol/l. Beim Vergleich der KICA-Dekarboxylierung in Fibroblasten mit Leucin und KICA als Ausgangssubstrat (Abb. 11, 12) (DANCIS u.Mitarb., 1977) wurde die Enzymfunktion tatsächlich in zwei unterschiedlichen intrazellulären KICA-Konzentrationsbereichen gemessen. Zur Untersuchung der Komponente der KICA-Dekarboxylierung mit geringer Substrataffinität werden ausreichend hohe intrazelluläre Substratkonzentrationen nur bei Inkubation der Fibroblasten mit KICA erzielt.

3. Bedeutung der zwei Enzymkomponenten der BCKA-Dekarboxylierung in Fibroblasten

Die Komponente mit geringer Substrataffinität der biphasischen KICA-Dekarboxylierungs-Kinetik könnte einer Dehydrogenase mit anderer α -Ketosäurenspezifität entsprechen, die mit geringer Geschwindigkeit auch verzweigtkettige α -Ketosäuren umsetzt. (KANZAKI u.Mitarb., 1969). Wahrscheinlich handelt es sich nicht um die Pyruvat-Dehydrogenase (WENDEL u.Mitarb., 1975).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die BCKA-Dehydrogenaseaktivität als Substratdekarboxylierung und nicht als overall-Reaktion über die Bildung von Acyl-Coenzym A (NAMBA u.Mitarb., 1969; RÜDIGER u.Mitarb., 1972b; RÜDIGER u.Mitarb., 1972c; BUHL u. SCRIVER, 1977) gemessen.

Das BCKA-Dekarboxylase(E_1)-Teilenzym kann aber im Rahmen des Gesamtzymkomplexes oder isoliert arbeiten. Die letztgenannte Reaktion benötigt keinen artifiziellen Elektronen- und Acylgruppenakzeptor, wenn der während der Ketosäure-Dekarboxylierung gebildete aktive Aldehyd (bei KICA: Hydroxyisovaleryl-TPP-Komplex) auf die Carbonylgruppe eines Aldehyds (bei KICA: Isovalerylaldehyd) anstelle der Liponsäure, unter Bildung von Acyloin übertragen wird (Abb. 19) (GUNSALUS, 1954; DECKER, 1959). Bei der Pyruvat-Dekarboxylierung wurde diese Acetoin-bildende Reaktion beschrieben (JUNI, 1952; DECKER, 1959; ALKONYI u. Mitarbeiter, 1976), die außer Mg^{2+} und TPP keine weiteren Cofaktoren benötigt.

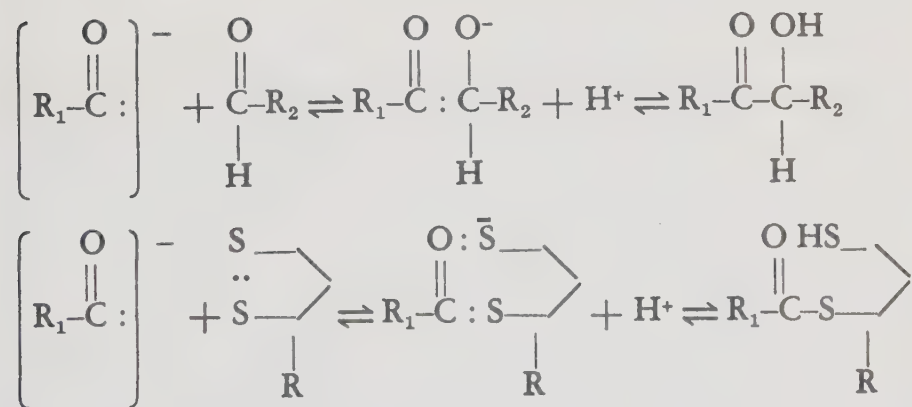


Abb. 19

Schematische Darstellung der Acyloinkondensation durch Transfer des "aktiven Aldehyds" auf freien Aldehyd (oben). Liponsäure ist dabei nicht erforderlich. Unten: Spaltung der Disulfidbrücke und Bildung eines Thioesters beim Transfer des aktiven Aldehyds auf Liponsäure (physiologische Reaktion). (Aus GUNSALUS, 1954).

Die biphasische Kinetik der Dekarboxylierung in normalen Zellen könnte durch unterschiedliche Kapazitäten für die Dekarboxylase und für die Übertragung des dekarboxylierten Fragments (aktiver Aldehyd) auf die Lipoylgruppe

der Transacylase erklärt werden. Nach Erreichen der maximalen Geschwindigkeit des physiologischen Produkttransfers wäre eine weitere Dekarboxylierung bis zu einem Maximum unter Übertragen des dekarboxylierten Fragments auf Aldehyd möglich. Nach dieser Interpretation entspräche die Komponente mit hoher Substrataffinität der Dekarboxylierung im Rahmen des Reaktionsablaufes am Gesamtzymkomplex, die mit geringer Affinität der Reaktion der isolierten Dekarboxylase-Einheit. Wie mit artifiziellen Elektronen- und Acylgruppen-Akzeptoren (Ferricyanid und H_2O , DCP) hätte die mit Aldehyd entkoppelte Dekarboxylase-Einheit eine höhere Michaelis-Konstante als die physiologische Dekarboxylierung mit Produktübertragung auf die Transacylase und -im Falle der intakten Fibroblasten in situ nachgewiesen- eine bedeutend höhere Kapazität. Als Erklärung könnte ein Überschuß an Dekarboxylase-Aktivität im Enzymkomplex speziell bei Fibroblasten oder ein Coenzymmangel der Transacylase-Reaktion unter den Kulturbedingungen der Zellen angeführt werden. Die monophasische Kinetik mit hoher Substrataffinität der KICA-Dekarboxylierung in normaler Leber, einem Organ, das eine zehnfach (Mensch) bis hundertfach (Ratte) höhere spezifische Aktivität der BCKA-Dehydrogenase als das extrahepatische Gewebe (z.B. Muskelgewebe) aufweist (SHINNICK u. HARPER, 1976; KHATRA u. Mitarb., 1977), mag andere Verhältnisse für die Leber anzeigen und auf eine organspezifische Komposition des Dehydrogenasekomplexes hinweisen.

Nach dieser Hypothese weisen sieben früher untersuchte MSUD-Zelllinien (WENDEL u. Mitarb., 1975) sowie sieben weitere Zelllinien (der in der Tab. 3 aufgeführten Patienten, unter ihnen die des Patienten PUR) eine gestörte Übertragung des "aktiven Aldehyds" auf Liponsäure auf, verursacht durch einen defekten Transfermechanismus (gestörte

Aggregation der Apoenzyme, defekte β -Einheiten eines möglichen tetrameren Dekarboxylase(E_1)-Teilenzyms, wie es im Pyruvat-Dehydrogenasekomplex vorliegt (KOIKE u. KOIKE, 1976)), oder aber - wahrscheinlicher - durch inaktive Transacylaseeinheiten. Die Affinität und Kapazität der Dekarboxylase-Einheiten entspricht in diesen Fällen etwa den Werten von Normalkontrollen und die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit dieser Komponente dürften im Rahmen der interindividuellen Variation von Fibroblasten liegen. Im Falle des Patienten AG (WENDEL u. Mitarb., 1975) und der Zelllinie DaMa (DANCIS u. Mitarb., 1977) war allerdings die Kapazität der Dekarboxylase(E_1) stark gegenüber der Norm reduziert, was auf einen Defekt dieses Teilenzyms durch Mutation schließen läßt.

Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungsergebnisse mit Leberenzym des Patienten PUR (s.o.) und durch Untersuchungen zerstörter Fibroblasten und Mitochondrienpräparationen (DANNER u. ELSAS, 1975).

Bei dem Patienten PUR zeigten Enzymuntersuchungen in der Leber einen Defekt der Transacylase an und entsprachen damit den Befunden mit Fibroblasten. DANNER u. ELSAS (1975) konnten durch Zusatz von TPP und Mg^{2+} die BCKA-Dekarboxylase(E_1) zerstörter Fibroblasten eines MSUD-Patienten und einer Normalperson in gleicher Weise stimulieren, und es resultierte eine Kinetik mit geringer Substrataffinität und hoher Kapazität. Von den drei BCKAs wurde allerdings nur MEVA umgesetzt. Eine Stimulation der MEVA-Dekarboxylierung mit CoASH und NAD, den Coenzymen der Transacylase, gelang nur bei Normalkontrollen, und die Enzymaktivität hatte eine hohe Substrataffinität und sehr geringe Kapazität.

Die Untersuchung der Kinetiken der BCKA-Dekarboxylierung intakter Fibroblasten von MSUD-Patienten scheint eine einfache Methode zur Lokalisierung des genetischen Defektes innerhalb des BCKA-Dehydrogenase-Enzymkomplexes zu

sein. Im Gegensatz zu zerstörten Fibroblasten (DANNER u. ELSAS, 1975) gelingt mit intakten Zellen die Messung der Dekarboxylierung aller drei BCKAs. Außerdem werden bei der Untersuchung intakter Zellen quantitative Beziehungen der Teilenzyme zueinander unter Belassung des Gesamtzymkomplexes unter natürlichen und experimentellen Bedingungen sichtbar. Im Gegensatz zur früheren Meinung (zitiert bei SCRIVER u. ROSENBERG, 1972), scheint nach den vorliegenden Ergebnissen der Enzymdefekt bei der MSUD überwiegend die Transacylase zu betreffen.

Acyloine wurden bisher weder bei Normalpersonen noch bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit beschrieben. Diese Ketoalkohole entstehen wahrscheinlich unter Normalbedingungen nicht, hingegen könnte man bei der MSUD im Falle der Stoffwechselentgleisung mit hohen Blutspiegeln von BCAAs und BCKAs die Bildung dieser Substanzen erwarten. Diese wahrscheinlich toxischen Substanzen, die analog dem Acetoin nach Reduktion zu sekundären Alkoholen und durch Glukuronierung entgiftet werden dürften (NEUBERG u. GOTTSCHALK, 1925; WESTERFELD u. BERG, 1943; FORST, 1966), müßten dann als Konjugate im Urin erscheinen. Bisher wurde nach entsprechenden Substanzen weder im Plasma noch im Urin gesucht (C. BACHMANN, K. WADMAN, U. LANGENBECK, pers. Mitteilungen).

ZUSAMMENFASSUNG

Der Ahornsirupkrankheit (MSUD) liegt ein erblicher Defekt im Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin auf der Stufe der oxidativen Dekarboxylierung der α -Ketosäurenanaloga (BCKAs) KIVA, MEVA und KICA zugrunde. Der hochmolekulare BCKA-Dehydrogenaskomplex ist durch Mutation in unterschiedlicher Weise verändert. Dementsprechend ist der klinische Phänotyp (schwere klassische Form und leichtere Varianten) mit dem Ausmaß des Enzymdefekts korreliert. Die Restaktivität der BCKA-Dehydrogenase in Fibroblasten geht der KICA-Dekarboxylierung, gemessen mit $[1-^{14}\text{C}]$ Leucin als Ausgangssubstrat parallel.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an intakten Fibroblasten durchgeführt zur Klärung der Frage, welches Teilenzym innerhalb des BCKA-Dehydrogenasekomplexes bei Ahornsirupkrankheit defekt ist. Bei einem Patienten konnten vergleichende Untersuchungen von Fibroblasten und Lebergewebe durchgeführt werden. Außerdem wurde der Intermediärstoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren und α -Ketosäuren am Beispiel von Leucin und KICA in Fibroblasten von Normalpersonen und von Patienten mit MSUD untersucht. Für die Untersuchungen der BCKA-Dekarboxylierung in Fibroblasten wurde eine radiochemische Mikrotestmethode eingesetzt, die für diagnostische Belange, besonders in der Pränataldiagnostik, entwickelt wurde.

Im ersten Teil der Arbeit werden Einzelheiten des Mikrotests zur Messung der BCKA-Dekarboxylierung in intakten Zellen (Fibroblasten und Amnionzellen) dargestellt. Dabei war der Einsatz von $[1-^{14}\text{C}]$ -markiertem Leucin als

Substrat von Vorteil, obwohl die Dekarboxylierung in den Zellen erst nach Transaminierung des Leucins zur KICA abläuft.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Ergebnisse der Pränataldiagnostik für die klassische Form der MSUD gezeigt. Durch Reduktion des für die biochemischen Untersuchungen notwendigen Zellmaterials - wenige Klone der Amnionzellprimärkultur reichen aus - läßt sich die Zeitspanne zwischen Amniocentese und Diagnosestellung erheblich verkürzen. Die verschiedenen Amnionzelltypen der Primärkultur (AF, F, E-Zelltyp nach HOEHN u. Mitarb., 1974) weisen keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Aktivität der KICA-Dekarboxylierung auf. Es wurde gezeigt, daß Amnionzellkulturen mit zunehmender Kulturdauer zwar höhere Zellzahlen, aber einen erheblichen Anteil metabolisch inaktiver Zellen enthalten, die zur biochemischen Diagnostik ungeeignet sind. Eine frühe Diagnostik mit einem entsprechenden Mikrotest ist deshalb anzustreben. Speziell durch die Testvorbereitung wird bei der beschriebenen Mikromethode ein Maximum an vitalen Zellen für die biochemische Untersuchung erzielt. Mykoplasmaabfall der Zellen verursacht keine Änderung der KICA-Dekarboxylierung.

Im dritten Teil der Arbeit werden Messungen der BCKA-Dekarboxylierung im Leberhomogenat eines Patienten mit klassischer MSUD dargestellt. Dabei wurde erstens die Aktivität des Gesamtenzymkomplexes unter Substitution aller Coenzyme und zweitens die Aktivität des funktionell isolierten Dekarboxylase-Teilenzym(E_1) mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor bestimmt. Die apparenten Enzymkonstanten für beide Reaktionen wurden für diesen Patienten und für Normalkontrollen ermittelt. Die spezifische

Aktivität der Dekarboxylase-Einheit war normal und der Defekt konnte auf die Transacylase lokalisiert werden. Dies entspricht auch dem Untersuchungsergebnis an Fibroblasten des Patienten.

Bei zwei Feten der 20. Schwangerschaftswoche, die als homozygote Genträger für die klassische MSUD identifiziert worden waren, war eine Aussage über den Enzymdefekt nicht möglich, da keine ausreichenden Vergleichsdaten mit normaler fetaler Leber vorliegen. Die spezifische Aktivität der fetalen Leber für die BCKA-Dehydrogenase scheint jedoch geringer zu sein als im Säuglingsalter. Untersuchungen an Fibroblasten der betroffenen Feten ließen auf ein Transacylasedefekt schließen.

Im vierten Teil der Arbeit werden Kinetiken der BCKA-Dekarboxylierung durch intakte Fibroblasten (mit verzweigtkettigen Ketosäuren als Ausgangssubstrat) von 15 Patienten mit verschiedenen MSUD-Typen im Vergleich zu Normalkontrollen analysiert. Es handelt sich nicht um Enzymkinetiken, da die intrazelluläre BCKA-Konzentration am Ort der Dehydrogenase (Mitochondrien) unbekannt bleibt und durch Membrantransport und Transaminierung beeinflusst wird.

Transportprozesse und Transaminierung in Fibroblasten wurden mit Leucin und KICA untersucht. Sowohl der Leucin- als auch der KICA-Transport in die Zellen weisen Charakteristika für einen saturablen Prozeß mit jeweils geringer Kapazität auf, zusätzlich besteht für KICA eine starke Diffusion.

Bei der Analyse des KICA- und Leucingehaltes von Fibroblasten unter steady-state-Bedingungen bei Kultur der Zellen in Medien mit unterschiedlicher Leucin- und

KICA-Konzentration überwog die Transaminierung im hohen Maße gegenüber der Dekarboxylierung, wie auch für Muskelgewebe bekannt ist. Das Transaminierungsgleichgewicht liegt in Fibroblasten mit 40:1 weit auf der Seite des Leucins. Entsprechend gering ist der intrazelluläre KICA-Gehalt bei hohen extrazellulären Leucinkonzentrationen. KICA wird bei Aufnahme in die Zelle so schnell zu Leucin transaminiert, daß der intrazelluläre KICA-Gehalt gering bleibt. Erst bei sehr hoher extrazellulärer KICA-Konzentration wird die Transaminierung durch das Ausmaß der KICA-Diffusion in die Zelle übertroffen. Zelllinien von MSUD-Patienten und Normalpersonen zeigen Unterschiede im Metabolismus der verzweigtkettigen Substanzen nur bei sehr geringem intrazellulären KICA-Gehalt.

Die Kinetiken der BCKA-Dekarboxylierung intakter Zellen weisen bei Normalkontrollen zwei Komponenten auf: eine mit hoher Substrataffinität und relativ geringer Kapazität und eine mit geringer Substrataffinität und deutlich höherer Kapazität. Die erstgenannte Komponente war in keinem untersuchten Fall von MSUD nachzuweisen. Sie entspricht dem defekten Genprodukt. Die Befunde wurden in der Weise gedeutet, daß die Komponente mit hoher Substrataffinität und geringer Kapazität der BCKA-Dekarboxylierung im Rahmen einer vollständigen Reaktion am Gesamtzymkomplex entspricht, die mit geringer Affinität und hoher Kapazität aber die Dekarboxylierung durch das funktionell isolierte Dekarboxylase-Teilenzym(E_1) des Komplexes darstellt, wobei freier Aldehyd als Elektronen- und Acylgruppenakzeptor unter Kondensation von Acyloinen wirkt. Demnach dürfte der Defekt bei nahezu allen untersuchten MSUD-Patienten nicht im Bereich der Dekarboxylase(E_1) lokalisiert sein, sondern im Bereich der Transacylase oder der Übertragung des dekarboxylierten Ketosäurefragments auf die Transacylase.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADIBI, S.A.:
Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition.
Metabolism 25: 1287-1302 (1976)
2. AKI, K., K. OGAWA, A. SHIRAI, a. A. ICHIHARA:
Transaminase of branched chain amino acids. III. Purification and properties of the mitochondrial enzyme from hog heart and comparison with the supernatant enzyme.
J.Biochem. 62: 610-616 (1967)
3. ALKONYI, I., E. BOLYGÓ, L. GYÓCSI, a. D. SZABÓ:
Studies on the formation of acetoin from acetaldehyde by the pyruvate dehydrogenase complex and its regulation.
Eur.J.Biochem. 66: 551-557 (1976)
4. ASTINE, J., E. FROYE, J.-M. LUCIANI, H. BELLET, P.M. DE BORNIER, e. D. BRUNEL:
Leucinose néo-natale d'evolution favorable. Problèmes évolutives et thérapeutiques.
Ann.Pédiat. 24: 605-610 (1977)
5. BENSON, J.V., J. CORMICK, a. J.A. PATTERSON:
Accelerated chromatography of aminoacids associated with phenylketonuria, leucinosi (maple syrup urine disease) and other inborn errors of metabolism.
Anal.Biochem. 18: 481-492 (1967)
6. BERGER, R., a. F.A. HOMMES:
Regulation of pyruvate metabolism in fetal liver. In: Normal and pathological development of energy metabolism. Eds.: HOMMES, F.A., a. C.J. VAN DEN BERG. Academic Press, London, New York, San Francisco (1975) pp. 97-107.

7. BLASS, J.P., J. AVIGAN, a. B.W. UHLENDORF:
A defect in pyruvate decarboxylase in a child with an
intermittent movement disorder.
J.Clin.Invest. 49: 423-432 (1970)
8. BLASS, J.P., S.D. CEDERBAUM, a. G.E. GIBSON:
Clinical and metabolic abnormalities accompanying
deficiencies in pyruvate oxidation. In: Normal and
pathological development of energy metabolism. Eds.:
HOMMES, F.A., a. C.J. VAN DEN BERG. Academic Press,
London, New York, San Francisco (1975) pp. 193-210
9. BLASS, J.P., G.E. GIBSON, a. R.A.P. KARK:
Pyruvate decarboxylase deficiency. In: Thiamine. Eds.:
GUBLER, C.J., M. FUJIWARA, a. P.M. DREYFUS. Wiley &
Sons. New York (1976) pp. 321-334.
10. BOOTH, C.W , a. H. L. NADLER:
Neutral amino acid transport in cultivated human skin
fibroblasts.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 148: 277-282 (1975)
11. BOWDEN, J.A., a. J.L. CONNELLY:
Branched-chain α -keto acid metabolism. II. Evidence for
the common identity of α -ketoisocaproic acid and
 α -keto- β -methylvaleric acid dehydrogenases.
J.Biol.Chem. 243: 3526-3531 (1968)
12. BOWDEN, J.A., C. L. McARTHUR III., a. M. FRIED:
The inhibition of pyruvate decarboxylation in rat
brain by α -ketoisocaproic acid.
Biochem.Med. 5: 101-108 (1971)
13. BREMER, J., a. E.J. DAVIS:
The effect of acylcarnitines on the oxidation of
branched chain α -keto acids in mitochondria.
Biochim.Biophys.Acta 528: 269-275 (1978)

14. BUHL, S., a. C.R. SCRIVER:
Thin-layer chromatography assay of the branched-chain
2-oxo acid dehydrogenase complex(es).
Biochem.Med. 18: 291-300 (1977)

15. CLARK, A. F., D. F. FARRELL, W. BURKE, C. R. SCOTT, a.
K. R. SWEDBERG:
The effect of mycoplasma contamination on the in vitro
assay of pyruvate dehydrogenase activity in cultured
fibroblasts.
Clin.Chim.Acta 82: 119-124 (1978)

16. CLARK, J. B., a. J. M. LAND:
Phenylketonuria and maple syrup disease and their
association with brain mitochondrial substrate
utilization. In: Normal and pathological development
of energy metabolism. Eds.: HOMMES, F. A., a. C. J.
VAN DEN BERG. Academic Press, London, New York,
San Francisco (1975) pp. 177-191.

17. CONNELLY, J. L., D. J. DANNER, a. J. A. BOWDEN:
Branched chain α -ketoacid metabolism. I. Isolation,
purification, and partial characterisation of bovine
liver α -ketoisocaproic: α -keto- β -methylvaleric acid
dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 243: 1198-1203 (1968)

18. Collective results of mass screening for inborn
metabolic errors in eight European countries.
Acta Paediat.Scand. 62: 413-416 (1973)

19. COX, R.P., J. HUTZLER, a. J. DANCIS:
Antenatal diagnosis of maple-syrup-urine disease.
Lancet II, 212 (1978)

20. CREE, T.C., S.M. HUTSON, a. A.E. HARPER:
Gas-liquid chromatography of α -keto acids:
Quantification of the branched-chain α -keto acids:
from physiological sources.
Analyt.Biochem. 92: 156-163 (1979)
21. DANCIS, J.:
The antepartum diagnosis of genetic diseases.
J.Pediat. 72: 301-302 (1968)
22. DANCIS, J., J. HUTZLER, a.R.P. COX:
Enzyme defect in skin fibroblasts in intermittent
branched-chain ketonuria and in maple syrup urine
disease.
Biochem.Med. 2: 407-411 (1969)
23. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. R.P. COX:
Evaluation of amino acid metabolism in maple syrup
urine disease. In: Tissue culture, methods and appli-
cations. Eds.: KRUSE, P.F., a. M.K. PATTERSON. JR.
Academic Press, New York (1973) pp. 639-643.
24. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. R.P. COX:
Maple syrup urine disease: Branched-chain keto acid
decarboxylation in fibroblasts as measured with amino
acids and ketoacids.
Am.J.Hum.Genet. 29: 272-279 (1977)
25. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. M. LEVITZ:
Metabolism of the white blood cells in maple syrup
urine disease.
Biochim.Biophys.Acta 43: 342-343 (1960)
26. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. M. LEVITZ:
Tissue distribution of branched chain ketoacid decarb-
oxylase.
Biochim.Biophys.Acta 52: 60-64 (1961)

27. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. M. LEVITZ:
The diagnosis of maple syrup urine disease
(branched-chain ketoaciduria) by the in vitro
study of the peripheral leukocyte.
Pediatrics 32: 234-238 (1963a)
28. DANCIS, J., J. HUTZLER, a. M. LEVITZ:
Detection of the heterozygote in maple syrup urine
disease.
J.Pediat. 66: 595-603 (1965)
29. DANCIS, J., J. HUTZLER, S.E. SNYDERMAN, a. R.P. COX:
Enzyme activity in classical and variant forms of
maple syrup urine disease.
J.Pediat. 81: 312-320 (1972)
30. DANCIS, J., V. JANSEN, J. HUTZLER, a. M. LEVITZ:
The metabolism of leucine in tissue culture of skin
fibroblasts of maple-syrup-urine disease.
Biochim.Biophys.Acta 77: 523-524 (1963b)
31. DANCIS, J., a. M. LEVITZ:
Abnormalities of branched chain amino acid metabolism.
In: The metabolic basis of inherited disease. Fourth
edition. Ed.: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN, a.
D.S. FREDRICKSON. McGraw-Hill, New York (1978) pp.
397-410.
32. DANNER, D.J., E.D. DAVIDSON, a. L.J. ELSAS:
Thiamine increases the specific activity of human
liver branched chain α -ketoacid dehydrogenase.
Nature 254: 529-530 (1975)
33. DANNER, D.J., a. L.J. ELSAS:
Subcellular distribution and cofactor function of
human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase in normal
and mutant cultured skin fibroblasts.
Biochem.Med. 13: 7-22 (1975)

34. DANNER, D.J., S.K. LEMMON, J.C. BESHARSE, a. L.J. ELSAS:
Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria.
J.Biol.Chem. 254: 5522-5526 (1979)
35. DANNER, D.J., S.K. LEMMON, a. L.J. ELSAS II:
Substrate specificity and stabilization by thiamine pyrophosphate of rat liver branched chain α -ketoacid dehydrogenase.
Biochem.Med. 19: 27-38 (1978a)
36. DANNER, D.J., F.B. WHEELER, S.K. LEMMON, a. L.J. ELSAS:
In vivo and in vitro response of human branched chain α -ketoacid dehydrogenase to thiamine and thiamine pyrophosphate.
Pediat.Res. 12: 235-238 (1978b)
37. DAWSON, A.G., a. F.J.R. HIRD:
Oxidation of l-valine by kidney preparations.
Arch.Biochem.Biophys. 127: 622-626 (1968)
38. DECKER, K.:
Die aktivierte Essigsäure. Enke, Stuttgart (1959).
S. 110 ff.
39. DENT, C.E., a. R.G. WESTALL:
Studies in maple syrup urine disease.
Arch.Dis.Childh. 36: 259-268 (1961)
40. DREYFUS, P.M., a. A.L. PRENSKY:
Further observations on the biochemical lesion in maple syrup urine disease.
Nature 214: 276 (1967)

41. DURAN, M., A.G.M. TIELENS, S.K. WADMAN, J.C.M. STIGTER, a. W.J. KLEIJER:
Effects of thiamine in a patient with a variant form of branched-chain ketoaciduria.
Acta Paediat.Scand. 67: 367-372 (1978)

42. EFRON, M.L., a. M.G. AMPOLA:
The aminoacidurias
Pediat.Clin.North.Amer. 14: 881-903 (1967)

43. ELSAS, L.J., a. D.J. DANNER:
Effect of thiamine on normal and mutant human branched chain α -ketoacid dehydrogenase. In: Thiamine. Eds.: GUBLER, C.J., M. FUJIWARA, P.M. DREYFUS. Wiley, New York (1976)

44. ELSAS, L.J., J.H. PRIEST, F.B. WHEELER, D.J. DANNER, a. B.A. PASK:
Maple syrup urine disease: Coenzyme function and prenatal monitoring.
Metabolism 23: 569-579 (1974)

45. FARRELL, D.F., A.F. CLARK, C.R. SCOTT, a. R.P. WENNBORG:
Absence of pyruvate decarboxylase activity in man:
A cause of congenital lactic acidosis.
Science 187: 1082-1084 (1975)

46. FENSOM, A.H., P.F. BENSON, a. J.A. BAKER:
A rapid method for assay of branched-chain keto acid decarboxylation in cultures cells and its application to prenatal diagnosis of maple syrup urine disease.
Clin.Chim.Acta 87: 169-174 (1978)

47. FLEISHER, L.D., D.K. RASSIN, R.J. DESNICK, H.R. SALWEN,
P. ROGERS, M. BEAN, a. G.E. GAULL:
Argininosuccinic aciduria: Prenatal studies in a family
at risk.
Am.J.Hum.Genet. 31: 439-445 (1979)
48. FOSTER, D.O., a. A.B. PARDEE:
Transport of amino acids by confluent and nonconfluent
3T3 and polyoma virus-transformed 3T3 cells growing on
glass cover slips.
J.Biol.Chem. 244: 2675-2681 (1969)
49. FORST, A.W.:
Entgiftung. In: Physiologische Chemie. Ein Lehr- und
Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker. 2. Band,
2. Teil, Bandteil d/ α . Der Stoffwechsel.
Hrsg.: FLASCHENTRÄGER, B. u. E. LEHNARTZ. Springer,
Berlin, Heidelberg, New York (1966) S. 180-182 und
S. 460-462.
50. GALJAARD, H.:
Pränatale Diagnose genetisch bedingter Stoffwechsel-
erkrankungen. In: Pränatale Diagnostik. Hrsg.: MURKEN,
J.-D. und S. STENGEL-RUTKOWSKI. Enke, Stuttgart (1978)
S. 50-81.
51. GAULL, G.E.:
Pathogenesis of maple syrup urine disease: Observation
during dietary management and treatment of coma by
peritoneal dialysis.
Biochem.Med. 3: 130-149 (1969)
52. GAULL, G.E., H.H. TALLAN, A. LAIJTHA, a. D.K. RASSIN:
Pathogenesis of brain dysfunction in inborn errors of
amino acid metabolism. In: Biology of brain dysfunction.
Vol. 3. Ed.: GAULL, G.E., Plenum, New York, London (1975)
pp. 47-143.

53. GERBIE, A.B., S.B. MELANCON, C. RYAN, a. H.L. NADLER:
Cultivated epithelial-like cells and fibroblasts from
amniotic fluid: Their relationship to enzymatic and
cytologic analysis.
Am.J.Obstet.Gynecol. 114: 314-320 (1972)
54. GIBSON, G.E., a. J.P. BLASS:
Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohy-
drate utilization by maple-syrup-urine disease meta-
bolites.
J.Neurochem. 26: 1073-1078 (1976)
55. GOEDDE, H.W., a. W. KELLER:
Metabolic pathways in maple syrup urine disease. In:
Amino acid metabolism and genetic variation. Ed.:
NYHAN, W.L.. McGraw-Hill, New York, Toronto, London
(1967) pp. 191-215.
56. GOEDDE, H.W., U. LANGENBECK, D. BRACKERTZ, W. KELLER,
T. ROKKONES, S. HALVORSEN, R. KIIL, a. B. MORTON:
Clinical and biochemical-genetic aspects of intermittent
branched-chain ketoaciduria. Report of two Scandinavian
families.
Acta Paediat.Scand. 59: 83-87 (1970)
57. GOEDDE, H.W., E. RICHTER, M. HÜFNER u. B. SIXEL:
Arbeitsvorschrift eines vereinfachten Heterozygoten-
tests für die Ahornsirup-Krankheit.
Klin.Wschr. 42: 818-819 (1964)
58. GROTH, U., a. L.E. ROSENBERG:
Transport of dibasic amino acids, cystine, and
tryptophan by cultured human fibroblasts: Absence of
a defect in cystinuria and Hartnup disease.
J.Clin.Invest. 51: 2130-2142 (1972)

59. GUBLER, C.J., a. R.L. MALQUIST:
Effects of conditions favoring enzyme phosphorylation and dephosphorylation on the activity of the α -keto acid dehydrogenases, with particular reference to the branched-chain α -keto acid dehydrogenase activities. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 86: 855-861 (1979)
60. GUNSALUS, I.C.:
Group transfer and acyl-generating fuctions of lipoic acid derivatives. In: Symposium on the mechanism of enzyme action. Eds.: McELROY, W.D., a. H.B. GLASS. Johns Hopkins Press, Baltimore (1954), pp. 545-580.
61. HAMMERSEN, G., L. WILLE, H. SCHMIDT, P. LUTZ, a. H. BICKEL:
Maple syrup urine disease: Treatment of the acutely ill newborn.
Eur.J.Pediatr. 129: 157-165 (1978)
62. HOEHN, H., E.M. BRYANT, L.E. KARP, a. G.M. MARTIN:
Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential.
Pediat.Res. 8: 746-754 (1974)
63. HUCHO, F.:
The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex.
Angew.Chem.Internat. Edit. 14: 591-601 (1975)
64. HUTSON, A.M., T.C. CREE, a. A.E. HARPER:
Regulation of leucine and α -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 253: 8125-8133 (1978)
65. ICHIHARA, A., C. NODA, a. K. OGAWA:
Control of leucine metabolism with special reference to branched-chain amino acid transaminase isozymes.
Advan.Enzyme Regu. 11: 155-166 (1973)

66. IKEDA, T., Y. KONISHI, a. A. ICHIHARA:
Transaminase of branched chain amino acids. XI. Leucine
(methionine) transaminase of rat liver mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 445: 622-631 (1976)
67. JAKOBS, C., E. SOLEM, J. EK, K. HALVORSEN, a. E. JELLUM:
Investigation of the metabolic pattern in maple syrup
urine disease by means of glass capillary gas
chromatography and mass spectrometry.
J. Chromatogr. 143: 31-38 (1977)
68. JUNI, E.:
Mechanism of the formation of acetoin by yeast and
mammalian tissue.
J. Biol. Chem. 195: 727-734 (1952)
69. KANZAKI, T., T. HAYAKAWA, M. HAMADA, Y. FUKUYOSHI, a.
M. KOIKE:
Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes. IV.
Substrate specificities and kinetic properties of the
pig heart pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase
complexes.
J. Biol. Chem. 244: 1183-1187 (1969)
70. KHATRA, B.S., R.K. CHAWLA, C.W. SEWELL, a. D. RUDMAN:
Distribution of branched-chain α -keto acid dehydrogenases
in primate tissues.
J. Clin. Invest. 59: 558-564 (1977)
71. KLEIJER, W.J., E.S. SACHS, a. M.F. NIERMEIJER:
Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases.
Histochem. J. 7: 496-498 (1975)
72. KOIKE, M., a. K. KOIKE:
Structure, assembly and function of mammalian α -keto
acid dehydrogenase complexes.
Adv. Biophys. 9: 187-227 (1976)

73. LANCASTER, G., O.A. MAMER, a. C. R. SCRIVER:
Branched-chain alpha -keto acids isolated as oxime derivatives: Relationship to the correspondig hydroxy acids and amino acids in maple syrup urine disease. Metabolism 23: 257-265 (1974)
74. LANGENBECK, U.:
Zur biochemischen Genetik der Ahornsirup-Krankheit. Habilitationsschrift, Göttingen, 1973
75. LANGENBECK, U., T. GRIMM, H.W. RÜDIGER, a. E. PASSARGE
Heterozygote tests and genetic counseling in maple syrup urine disease: An application of Bayes' theorem. Humangenetik 27: 315-322 (1975)
76. LANGENBECK, U., H.W. RÜDIGER, M. SCHULZE-SCHENCKING, W. KELLER, D. BRACKERTZ, a. H. W. GOEDDE:
Evaluation of a heterozygote test for maple syrup urine disease in leucocytes and cultured fibroblasts. Humangenetik 11: 304-315 (1971)
77. LANGENBECK, U., U. WENDEL, A. MENCH-HOINOWSKI, D. KUSCHEL, K. BECKER, H. PRZYREMBEL, a. H.J. BREMER:
Correlations between branched-chain amino acids and branched-chain α -keto acids in blood in maple syrup urine disease. Clin.Chim.Acta 88: 283-291 (1978)
78. LIAO, C.L., M.M. HERMAN, a. K.G. BENSCH:
Prolongation of G₁ and S phase in C-6 glioma cells treated with maple syrup urine disease metabolites. Morphologic and cell cycle studies. Lab.Invest. 38: 122-133 (1978)
79. LINEWEAVER, H., a. D. BURK:
The determination of enzyme dissociation constants. J.Amer.Chem.Soc. 56: 658-666 (1934)

80. LOWRY, O.H., N. J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, a.
R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193: 265-275 (1951)
81. LYONS, L.B., R.P. COX, a. J. DANCIS:
Complementation analysis of maple syrup urine disease
in heterokaryons derived from cultured human fibroblasts
Nature 243: 533-535 (1973)
82. McGIVAN, J.D., N.M. BRADFORD, a. J. MENDES-MOURÃO:
The transport of branched-chain amino acids into
isolated rat liver cells.
FEBS Letters 80: 380-384 (1977)
83. Mc KNIGHT, M.T., a. M.W. SPENCE:
Attempted detection of heterozygotes for maple-syrup-
urine disease.
Clin.Genet. 3: 458-464 (1972)
84. MEISTER, A.:
Preparation of α -keto acids.
Methods Enzymol. 3: 404-414 (1957)
85. MELANCON, S.B., S.Y. LEE, a. H.L. NADLER:
Histidase activity in cultivated human amniotic fluid
cells.
Science 173: 627-628 (1971)
86. MELANCON, S.B., J. TAYCO, a. H.L. NADLER:
The free amino acid pool of cultivated human skin
fibroblasts.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 141: 391-395 (1972)
87. MENKES, J.H.:
Maple syrup disease. Isolation and identification of
organic acids in the urine.
Pediatrics 23: 348-353 (1959)

88. MENKES, J.H., P.L. HURST, a. J.M. CRAIG:
A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral
dysfunction associated with an unusual urinary substance
Pediatrics 14: 462-466 (1954)
89. MITCH, W.E., a. W. CHAN:
Transamination of branched-chain keto acids by
isolated perfused rat kidney.
Am.J.Physiol. 235: E47-E52 (1978)
90. MORROW, G.III, B. REVSIN, C. MATHEWS, a. H. GILES:
A simple, rapid method for prenatal detection of defects
in propionate metabolism.
Clin.Genet. 10: 218-221 (1976)
91. NAMBA, Y., K. YOSHIZAWA, A. EJIMA, T. HAYASHI, a.
T. KANEDA:
Coenzyme A- and nicotinamide adenine dinucleotide-
dependent branched chain α -keto acid dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 244: 4437-4447 (1969)
92. NAYLOR, E.W., a. R. GUTHRIE:
Newborn screening for maple syrup urine disease
(branched-chain ketoaciduria).
Pediatrics 61: 262-266 (1978)
93. NEAME, K.D., a. T.G. RICHARDS:
Analysis of experimental data. In: Elementary kinetics
of membrane carrier transport. Wiley & Sons, New York
(1972) pp. 41-55
94. NEUBERG, C., u. A. GOTTSCHALK:
Über das physiologische Verhalten des Acetoin. II.
Mitteilung: Über das Verhalten des Acetoin im Tier-
körper.
Biochem.Z. 162: 484-488 (1975)

95. PARKER, P.J., a. P.J. RANDLE:
Branched chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex of
rat liver.
FEBS Letters 90: 183-186 (1978)
96. PATEL, M.S., a. O.E. OWEN:
The metabolism of leucine by developing rat brain:
Effect of leucine and 2-oxo-4-methylvalerate on lipid
synthesis from glucose and ketone bodies.
J.Neurochem. 30: 775-782 (1978)
97. PAUL, H.S., a. S.A. ADIBI:
Effect of carnitine on branched-chain amino acid
oxidation by liver and skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 234: E 494 - E 499 (1978)
98. PROZEFSKY, T., a. M. WALSER:
Effect of intraarterial infusion of the keto analogue
of leucine on amino acid release by forearm muscle.
Metabolism 26: 807-815 (1977)
99. PRZYREMBEL, H., D. BACHMANN, I. LOMBECK, K. BECKER,
U. WENDEL, S.K. WADMAN, a. H.J. BREMER:
Alpha-ketoadipic aciduria, a new inborn error of
lysine metabolism; biochemical studies.
Clin.Chim.Acta 58: 257-269 (1975)
100. PUESCHEL, S.M., M.J. BRESNAN, V.E. SHIH, a. H.L. LEVY:
Thiamine-responsive intermittent branched-chain
keto aciduria.
J.Pediatr. 94: 628-631 (1979)
101. REED, L.J., T.C. LINN, a. F.H. PETTIT:
Pyruvate dehydrogenase complex: Structure, function and
regulation. In: Energy metabolism and regulation of
metabolic processes in mitochondria. Ed.: MEHLMAN, M.A.,
Academic Press, London, New York, Toronto (1972) pp.
253-270.

102. REED, L.J., a. C.R. WILLMS:
Pyruvate decarboxylase.
Methods Enzymol. 9: 258-261 (1966)
103. ROBINSON, B.H., a. W.G. SHERWOOD:
Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: A
cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy
Pediat.Res. 9: 935-939 (1975)
104. ROBINSON, B.H., J. TAYLOR, a. W.G. SHERWOOD:
Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase (a component
of the pyruvate and α -ketoglutarate dehydrogenase
complexes): A cause of congenital chronic lactic
acidosis in infancy.
Pediat.Res. 11: 1198-1202 (1977)
105. ROSENBERG, L.E.:
Disorders of propionate, methylmalonate, and cobalamin
metabolism. In: The metabolic basis of inherited
disease. Fourth edition. Eds.: STANBURY, J.B., J.B.
WYNGAARDEN, a. D.S. FREDRICKSON. McGraw-Hill, New York
(1978) pp. 411-429.
106. RÜDIGER, H.W., U. LANGENBECK, D. BRACKERTZ, a. H.W.
GOEDDE:
Lipoic acid dependency of human branched chain α -keto
acid oxidase.
Biochim.Biophys. Acta 264: 220-223 (1972b)
107. RÜDIGER, H.W., U. LANGENBECK, a. H.W. GOEDDE:
A simplified method for the preparation of ^{14}C -labelled
branched-chain α -oxo acids.
Biochem.J. 126: 445-446 (1972a)

108. RÜDIGER, H.W., U. LANGENBECK, a. H.W. GOEDDE:
Oxidation of branched chain α -keto acids in streptococcus faecalis and it's dependence on lipoic acid.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 875-882 (1972c)

109. RÜDIGER, H.W., U. LANGENBECK, M. SCHULTZE-SCHENCKING, a. H.W. GOEDDE:
Defective decarboxylase in branched chain ketoacid oxidase multienzyme complex in classic type of maple syrup urine disease.
Humangenetik 14: 257-263 (1972)

110. RUSSELL, W.C., C. NEWMAN, a. D.H. WILLIAMSON:
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.
Nature 253: 461-462 (1975)

111. SCHULMAN, J.D., T.J. LUSTBERG, J.L. KENNEDY, M. MUSELES, a. J.E. SEEGMILLER:
A new variant of maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria).
Amer.J.Med. 49: 118-124 (1970)

112. SCRIVER, C.R. For the Committee for improvement of hereditary disease management:
Management of maple syrup urine disease in Canada.
C.M.A. Journal 115: 1005-1009 (1976)

113. SCRIVER, C.R., C.L. CLOW, S. MACKENZIE, a. E. DELVIN:
Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease.
Lancet I, 310-312 (1971)

114. SCRIVER, C.R., a. L.E. ROSENBERG:
Amino acid metabolism and its disorders. Saunders, Philadelphia (1973) pp. 256-289.

115. SEEGMILLER, J.E., a. R.G. WESTALL:
The enzyme defect in maple syrup urine disease
(branched-chain ketoaciduria)
J.Ment.Defic.Res. 11: 288-294 (1967)
116. SHIH, V.E., R. MANDELL, H.L. LEVY, a. J.W. LITTLEFIELD
Free amino acids in extracts of cultured skin fibro-
blasts from patients with various amino acid metabolic
disorders.
Clin.Genet. 7: 421-425 (1975)
117. SHINNICK, F.L., a. A.E. HARPER:
Branched-chain amino acid oxidation by isolated rat
tissue preparations.
Biochim.Biophys.Acta 437: 477-486 (1976)
118. SILBERBERG, D.H.:
Maple syrup urine disease metabolites studied in
cerebellum cultures.
J.Neurochem. 16: 1141-1146 (1969)
119. SKAPER, S.D., D.P. MOLDEN, a. J.E. SEEGMILLER:
Maple syrup urine disease: Branched-chain amino acid
concentrations and metabolism in cultured human lympho-
blasts.
Biochem.Genet. 14: 527-539 (1976)
120. SNYDERMAN, S.E., P.M. NORTON, E. ROITMAN, a. L.E. HOLT:
Maple syrup urine disease with particular reference to
dieta-therapy.
Pediatrics 34: 454-472 (1964)
121. STRÖMME, J.H., O. BORUD, a. P.J. MOE:
Fatal lactic acidosis in a newborn attributable to a
congenital defect of pyruvate dehydrogenase.
Pediat.Res. 10: 60-66 (1976)

122. STUMPF, D.A., a. J.K. PARKS:
Friedreich's ataxia: I. Normal pyruvate dehydrogenase complex activity in platelets.
Ann.Neurol. 4: 366-368 (1978)
123. SULLIVAN, S.G., J. DANCIS, a. R.P. COX:
Modulation of branched-chain α -keto acid decarboxylase activity in rat liver mitochondria by hypophysectomy.
Arch.Biochem.Biophys. 176: 225-234 (1976)
124. SUTHERLAND, G R., R. BAULD, a. A.D. BAIN:
Observations on human amniotic fluid cell strains in serial culture.
J.Med.Genet. 11: 190-195 (1974)
125. TARPEY, M.M., R.C. WILLIS, a. J.E. SEEGMILLER:
Uptake of α -ketoisocaproic acid in lymphoblast line WI-L2.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 76: 1267-1275 (1977)
126. TAYLOR, J., B.H. ROBINSON, a. W.G. SHERWOOD:
A defect in branched-chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency.
Pediat.Res. 12: 60-62 (1978)
127. TAYLOR, R.T., V. SHAKESPEARE, a. W.T. JENKINS:
Branched chain amino acid aminotransferase.IV.
Kinetics of the transamination reactions.
J.Biol.Chem. 245: 4880-4885 (1970)
128. UHLENDORF, B.W.:
Use of amniotic fluid and reliability of diagnostic procedures. In: Early diagnosis of human genetic defects
Fogarty Int.Proc. 6: 149-168 (1970)

129. VAN DER VEER, E., W.J. KLEIJER, J.E. DE JOSSELIN DE JONG, a. H. GALJAARD:
Lysosomal enzyme activities in different types of amniotic fluid cells measured by microchemical methods, combined with interference microscopy.
Hum.Genet. 40: 285-292 (1978)
130. VON KORFF, R.W.:
Pyruvate-C¹⁴, purity and stability.
Anal.Biochem. 8: 171-178 (1964)
131. WALSER, M., P. LUND, N.B. RUDERMAN, a. W. COULTER:
Synthesis of essential amino acids from their α -keto analogues by perfused rat liver and muscle.
J.Clin.Invest. 52: 2865-2877 (1973)
132. WEBER, F.L.JR., S.B. DEAK, a. R.A. LAINE:
Absorption of keto-analogues of branched-chain amino acids from rat small intestine.
Gastroenterology 76: 62-70 (1979)
133. WENDEL, U., K. BECKER, H. PRZYREMBEL, M. BULLA, C. MANEGOLD, A. MENCH-HOINOWSKI, a. U. LANGENBECK:
Peritoneal dialysis in maple-syrup-urine disease: Studies on branched-chain amino and keto acids.
Eur.J.Pediatr. 134: 57-63 (1980)
134. WENDEL, U., a. U. CLAUSSEN:
Antenatal diagnosis of maple-syrup-urine disease.
Lancet I, 161-162 (1979)
135. WENDEL, U., H. PRZYREMBEL, K. BECKER, B. WALTHER, R. BERGER u. H.J. BREMER:
Pyruvatdehydrogenase-Mangel - letaler Verlauf im Säuglingsalter.
Mschr.Kinderheilk. 126: 140-147 (1978)

136. WENDEL, U., H.W. RÜDIGER, E. PASSARGE, a. M. MIKKELSEN:
Maple syrup urine disease: Rapid prenatal diagnosis by
enzyme assay.
Humangenetik 19: 127-128 (1973a)
137. WENDEL, U., H.W. RÜDIGER, H. PRZYREMBEL, a. H.J. BREMER:
Alpha-ketoadipic aciduria: Degradation studies with
fibroblasts.
Clin.Chim.Acta 58: 271-276 (1975)
138. WENDEL, U., H. WENTRUP, a. H.W. RÜDIGER:
Maple syrup urine disease: Analysis of branched chain
ketoacid decarboxylation in cultured fibroblasts.
Pediat.Res. 9: 709-717 (1975)
139. WENDEL, U., W. WÖHLER, H.W. GOEDDE, U. LANGENBECK,
E. PASSARGE, a. H.W. RÜDIGER:
Rapid diagnosis of maple syrup urine disease (branched
chain ketoaciduria) by micro-enzyme assay in leukocytes
and fibroblasts.
Clin.Chim.Acta 45: 433-440 (1973)
140. WESTALL, R.G., J. DANCIS, a. S. MILLER:
Maple sugar urine disease.
Amer.J.Dis.Child. 94: 571-572 (1957)
141. WESTERFELD, W.W., a. R.L. BERG:
Observations on the metabolism of acetoin.
J.Biol.Chem. 148: 523-528 (1943)
142. WILLEMS, J.L.:
Disturbances in pyruvate metabolism. A. biochemical
and clinical investigation.
Doctor Thesis, Nijmegen, 1978.

143. WILLEMS, J.L., A.F.M. DE KORT, T.B. VREE,
J.M.F. TRIJBELS, J.H. VEERKAMP, a. L.A.H. MONNENS:
Non-enzymic conversion of pyruvate in aqueous solution
to 2,4-dihydroxy-2-methylglutaric acid.
FEBS-Letters 86: 42-44 (1978)
144. WILSON, R.W., C.M. WILSON, S.C. GATES, a. J.V. HIGGINS
 α -ketoadipic aciduria: A description of a new metabolic
error in lysine-tryptophan degradation.
Pediat. Res. 9: 522-526 (1975)
145. WOHLHUETER, R.M., a. A.E. HARPER:
Coinduction of rat liver branched-chain α -keto acid-
dehydrogenase activities.
J.Biol.Chem. 245: 2391-2401 (1970)
146. PETTIT, F.H., S.J. YEAMAN, a. L.J. REED:
Purification and characterization of branched chain
 α -keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75: 4881-4885 (1978)

Dank schulde ich Herrn Professor Dr. U. Langenbeck, Institut für Humangenetik der Universität Göttingen, der die Bestimmung der verzweigt-kettigen α -Ketosäuren übernahm. Mit ihm bestand während der letzten Jahre eine fruchtbare Zusammenarbeit, durch die sich einige wesentliche klinisch-chemische Zusammenhänge bei Ahornsirupkranken Kindern unserer Klinik klären ließen. Weiterer Dank gilt Herrn Dr. U. Claussen, vom hiesigen Institut für Humangenetik und Anthropologie, der Amnionzellkulturen zur Verfügung stellte und die Zellkultur im Falle der Pränataldiagnostik auf Ahornsirupkrankheit übernahm.

